



**Fernanda Ramalho de Oliveira**

Licenciada em Química Industrial

# **Implementação e Validação de Métodos de Ensaio para Análise de Novos Compostos Orgânicos Emergentes em Águas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Química Bioorgânica

Orientadores: Doutor Vítor Vale Cardoso, EPAL, SA

Doutora Andreia Vanessa Saraiva Videira, EPAL, SA

Elo de Ligação: Professora Doutora Paula Cristina de Sérió Branco, FCT/UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Outubro, 2021**





**Fernanda Ramalho de Oliveira**

Licenciada em Química Industrial

# **Implementação e Validação de Métodos de Ensaio para Análise de Novos Compostos Orgânicos Emergentes em Águas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Química Bioorgânica

Orientadores: Doutor Vítor Vale Cardoso, EPAL, SA

Doutora Andreia Vanessa Saraiva Videira, EPAL, SA

Elo de Ligação: Professora Doutora Paula Cristina de Sérió Branco, FCT/UNL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Outubro, 2021**



## **Implementação e Validação de Métodos de Ensaio para Análise de Novos Compostos Orgânicos Emergentes em Águas**

Copyright © Fernanda Ramalho de Oliveira, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



*Dedico este trabalho a Deus que me deu forças para concluir este projeto de forma satisfatória e aos meus pais que são os maiores incentivadores da realização dos meus sonhos.*





## **Agradecimentos**

Na estrada da vida caminhar sozinho é o mesmo que estar parado. Por isso, gostaria de expressar a minha mais sincera gratidão a todos que me acompanharam nessa caminhada e tornaram este trabalho entusiasmante, desafiador e ao mesmo tempo tão estimado.

À Dr.<sup>a</sup> Paula Branco por ter atendido ao meu pedido desesperado por uma tese na área da química analítica e ter me proposto a realização deste estágio que me agregou inúmeros conhecimentos.

Ao Dr. Vítor Cardoso, orientador na EPAL, pelo sua receção, disponibilidade, entusiasmo, competência e paciência na supervisão deste trabalho.

À Dr.<sup>a</sup> Andreia Videira, orientadora interna, pelo empenho e dedicação neste trabalho e pela confiança em mim depositada. Não há palavras para agradecer todo o conhecimento que partilhastes comigo durante quase um ano.

À Dr.<sup>a</sup> Ana Penetra, que orientou este trabalho durante os estudos iniciais quando ainda pensávamos ser possível implementar os novos compostos utilizando a cromatografia gasosa, muito obrigada pela sua disponibilidade e ajuda.

Ao Dr. Alexandre Rodrigues, Dr.<sup>a</sup> Ana Neto, Dr.<sup>a</sup> Cristina Correia, Sofia Alexandra, Catarina Vitorino e Raquel por todo apoio e simpatia durante esta caminhada.

À Dr.<sup>a</sup> Cristina Almeida, por todas as suas dicas durante a escrita e formatação desta tese.

À Dr.<sup>a</sup> Helenice Garcia e ao Dr. João Severo, meus primeiros orientadores académicos que acreditaram imensamente no meu potencial.

Não poderia deixar de agradecer à Vânia Cristina e à Gabriela, que me proporcionaram alívio cômico durante essa jornada.

Por fim, a todos os meus amigos e familiares que estavam deste lado do oceano Atlântico, e aos que estavam do outro lado também, muito obrigada por me apoiarem e entenderem a minha ausência.



## Resumo

Este trabalho consistiu na implementação e validação de nove pesticidas e três fármacos em métodos de ensaios realizados em rotina pela EPAL (Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A.) para águas de captações e de consumo humano provenientes das zonas de abastecimento da EPAL e da AdTV (Águas do Vale do Tejo).

A escolha de tais compostos esteve de acordo com a terceira lista de vigilância publicada pelo Jornal Oficial da União Europeia em agosto de 2020, que possui como um de seus objetivos melhorar a base de informação para a futura identificação de substâncias prioritárias, em particular no que se refere a contaminantes emergentes.

A metodologia analítica selecionada inicialmente para os pesticidas foi a cromatografia gasosa associada a um detetor de massa do tipo simples quadrupolo (GC/MS). Tendo em conta os resultados obtidos, foi necessário abandonar esta metodologia analítica como ferramenta de análise dos compostos em estudo.

Assim sendo, a implementação e validação de um método de ensaio para análise dos pesticidas e fármacos em estudo foi efetuada por cromatografia líquida de ultra eficiência associada à espectrometria de massa *tandem* (UPLC-MS/MS), utilizando como método de preparação da amostra a extração em fase sólida (SPE).

Inicialmente para as duas classes de substâncias foram efetuadas as otimizações, no espectrómetro de massa, das melhores condições de formação do ião precursor (sendo utilizado o *electrospray* como método de ionização) e dos parâmetros relacionados à formação dos iões produtos, de maneira a definir as transições MRM de quantificação e qualificação característica de cada composto.

Após definidas as condições operativas do espectrómetro de massa, foram efetuados ajustes das condições cromatográficas, quando necessário, com o intuito de se obter o menor tempo de corrida possível sem afetar a sensibilidade e a resolução dos compostos.

A validação do método analítico foi realizada através da aplicação de testes estatísticos, de modo a avaliar a gama de trabalho, os limiares analíticos, a precisão e a exatidão.

Por fim, foram analisadas algumas amostras de água de modo a avaliar a ocorrência de fármacos e pesticidas no sistema de abastecimento da EPAL e da AdVT.

**Palavras chave:** Água, compostos emergentes, lista de vigilância, cromatografia líquida de ultra resolução, espectrometria de massa *tandem*, extração em fase sólida.



## Abstract

The main goal of this work was the implementation and validation of an analytical method for the analysis of nine pesticides and three azole pharmaceuticals in raw water and in water for human consumption from the water supply areas of EPAL and AdTV.

The choice of such compounds was in accordance with the third watch list published by the Official Journal of the European Union in August 2020, which has as one of its objectives the improvement of the information base for future identification of priority substances, considered as emerging pollutants.

The analytical methodology initially selected for the analysis of pesticides was gas chromatography associated with a single quadrupole mass detector (GC/MS). Taking into account the obtained results, it was necessary to drop out this analytical methodology as a tool for analyzing the compounds under study.

Therefore, the development and validation of an analytical method for the analysis of pesticides and azole pharmaceuticals was carried out by ultra performance liquid chromatography associated with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), using solid phase extraction (SPE) as a sample preparation method.

For the two classes of substances, the mass spectrometer conditions were optimized to obtain the best conditions for the formation of the precursor ion (with electrospray being used as the ionization method) and for the parameters related with formation of the product ions, in order to define the quantification and qualification MRM transitions characteristic of each compound.

After setting the operating conditions of the mass spectrometer, adjustments were made to the chromatographic conditions, when necessary, in order to obtain the shortest possible run time without affecting the sensitivity and resolution of the compounds.

The validation of the analytical method was performed through the application of several statistical tests, in order to evaluate the working range, analytical limits, precision and accuracy.

Finally, several water samples were analyzed in order to assess the occurrence of azole pharmaceuticals and pesticides in the water supply system of EPAL and AdVT.

**Keywords:** Water, emerging compounds, watch list, ultra performance liquid chromatography, tandem mass spectrometry, solid phase extraction.



# Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract .....	v
Índice de Figuras .....	xv
Índice de Tabelas .....	xix
Símbolos, Siglas, Abreviaturas e Acrónimos.....	xxiii
<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1 - Controlo de Qualidade da Água .....</b>	<b>3</b>
1.1 Água.....	3
1.2 Organização Nacional do Setor da Água .....	4
1.3 EPAL .....	6
1.3.1 Programa de Monitorização da Qualidade da Água no Sistema de Abastecimento da EPAL .....	7
1.4 Enquadramento Legal .....	8
1.5 Lista de Vigilância .....	9
<b>Capítulo 2 - Pesticidas .....</b>	<b>13</b>
2.1 Nota Introdutória.....	13
2.1.1 Toxicidade dos Pesticidas .....	13
2.1.1.1 Desreguladores Endócrinos.....	14
2.1.2 Classificação dos Pesticidas.....	15
2.1.2.1 Inseticidas .....	16
2.1.2.2 Herbicidas .....	17
2.1.2.3 Fungicidas .....	17
2.2 Pesticidas Homologados .....	18
2.3 Legislação em Vigor .....	18
<b>Capítulo 3 – Fármacos.....</b>	<b>21</b>
3.1 Notas Introdutórias.....	21

3.1.1 Efeitos no Ambiente .....	21
3.1.2 Classificação dos Fármacos .....	22
3.2 Legislação em Vigor .....	24
<b>Capítulo 4 – Metodologias Analíticas.....</b>	<b>25</b>
4.1 Notas Introdutórias.....	25
4.2 Preparação da Amostra – Extração em Fase Sólida.....	25
4.2.1 Notas Introdutórias.....	25
4.2.2 Processo de Funcionamento da SPE .....	27
4.2.3 Fatores que Influenciam na Seletividade e Eficiência da SPE.....	29
4.3 Cromatografia .....	29
4.3.1 Nota Introdutória.....	29
4.3.2 Princípios Teóricos .....	30
4.4 Cromatografia Gasosa.....	36
4.4.1 Nota Introdutória.....	36
4.4.2 Cromatógrafo Gasoso .....	36
4.4.2.1 Gás de Arraste.....	37
4.4.2.2 Injetor.....	37
4.4.2.3 Coluna Cromatográfica .....	39
4.4.2.4 Forno.....	39
4.4.2.5 Detetor.....	40
4.5 Cromatografia Gasosa associada à Espectrometria de Massa.....	40
4.5.1 Espectrometria de Massa .....	41
4.5.1.1 Fonte de Ionização .....	42
4.5.1.2 Analisador de Massas.....	43
4.5.1.3 Detetor.....	45
4.6 Cromatografia Líquida.....	45
4.6.1 Nota Introdutória.....	45
4.6.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.....	46
4.7 Cromatografia Líquida associada à Espectrometria de Massa.....	48
4.7.1 Espectrometria de Massa .....	48
4.7.1.1 Fonte de Ionização .....	49
4.7.1.2 Analisador de Massas.....	51
4.8 Efeito da Matriz .....	53



<b>Capítulo 5 – Validação do Método Analítico.....</b>	<b>57</b>
5.1 Nota Introdutória.....	57
5.2 Sensibilidade.....	57
5.3 Seletividade.....	57
5.4 Precisão.....	58
5.4.1 Repetibilidade.....	59
5.4.2 Precisão Intermédia.....	59
5.4.3 Reprodutibilidade.....	59
5.5 Exatidão.....	59
5.6 Quantificação.....	60
5.6.1 Curvas de Calibração.....	60
5.6.2 Limiares Analíticos do Método de Ensaio.....	61
<b>Capítulo 6 – Parte Experimental.....</b>	<b>65</b>
6.1 Determinação Quantitativa de Pesticidas por GC/MS.....	65
6.1.1 Equipamento e Material.....	65
6.1.1.1 Equipamento.....	65
6.1.1.2 Material.....	65
6.1.2 Reagentes.....	65
6.1.2.1 Reagentes Gerais.....	65
6.1.2.2 Padrões Primários.....	66
6.1.3 Preparação de Soluções.....	66
6.1.3.1 Solução Mãe de Pesticidas.....	66
6.1.3.2 Solução Padrão Conjunta de Pesticidas.....	67
6.1.3.3 Soluções Padrão para Validação da Gama de Trabalho.....	67
6.1.3.3.1 Solução Padrão Intermédia para Estudo da Linearidade.....	67
6.1.3.3.2 Soluções Padrão de Trabalho para Estudo da Linearidade.....	67
6.1.4 Método Analítico GC/MS.....	68
6.1.4.1 Condições Cromatográficas.....	68
6.1.4.2 Condições do Espectrómetro de Massa.....	69
6.1.5 Validação do Método Analítico GC/MS.....	70
6.2 Determinação Quantitativa de Pesticidas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS.....	70
6.2.1 Equipamento e Material.....	70
6.2.1.1 Equipamento.....	70
6.2.1.2 Material.....	71

6.2.2 Reagentes .....	71
6.2.2.1 Reagentes Gerais.....	71
6.2.2.2 Padrões Primários .....	72
6.2.2.3 Padrões <i>Surrogate</i> .....	73
6.2.2.4 Amostras .....	73
6.2.3 Preparação de Soluções.....	73
6.2.3.1 Fase Móvel.....	73
6.2.3.2 Soluções Padrão .....	74
6.2.3.2.1 Soluções Mãe de Pesticidas .....	74
6.2.3.2.2 Solução Padrão Conjunta de Pesticidas .....	74
6.2.3.2.3 Soluções Mãe dos “ <i>Surrogate</i> ” .....	75
6.2.3.2.4 Solução Padrão Conjunta dos “ <i>Surrogate</i> ” .....	76
6.2.3.2.5 Solução Padrão Intermédia dos “ <i>Surrogate</i> ” .....	76
6.2.3.3 Soluções para a Otimização das Condições de Operação do Espectrómetro de Massa.....	77
6.2.3.3.1 Soluções Padrão Individuais para Infusões.....	77
6.2.3.4 Soluções Padrão para Validação da Gama de Trabalho.....	77
6.2.3.4.1 Solução Padrão Intermédia para Estudo da Linearidade.....	77
6.2.3.4.2 Soluções Padrão de Trabalho para Estudo da Linearidade .....	78
6.2.3.5 Soluções Padrão para o Estudo da Precisão .....	80
6.2.3.6 Soluções Padrão de Pesticidas para Fortificação .....	80
6.2.3.6.1 Solução para a Determinação do LOQ.....	80
6.2.3.6.2 Solução Padrão Intermédia para Determinação do LOQ.....	81
6.2.3.7 Solução para o Estudo do Efeito da Matriz.....	81
6.2.4 Método Analítico SPE-UPLC- ESI-MS/MS.....	82
6.2.4.1 Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa.....	82
6.2.4.2 Condições Cromatográficas .....	83
6.2.4.3 Condições do Espectrómetro de Massa.....	83
6.2.4.3.1 Condições do Método Instrumental .....	83
6.2.4.3.2 Condições de Operação da <i>Tune</i> .....	85
6.2.4.4 Preparação da Amostra (SPE).....	86
6.2.5 Validação do Método Analítico UPLC-ESI- MS/MS.....	87
6.2.5.1 Testes de Linearidade.....	87
6.2.5.2 Precisão em Condições de Repetibilidade .....	87
6.2.5.3 Precisão Intermédia.....	87
6.2.5.4 Limiares Analíticos Instrumentais .....	87
6.2.6 Validação do Método Analítico SPE-UPLC-ESI- MS/MS.....	88

6.2.6.1 Efeito da Matriz .....	88
6.2.6.1.1 Precisão dos Ensaios de Recuperação em Diferentes Matrizes .....	88
6.2.6.1.2 Efeito da Matriz em diferentes níveis de concentração.....	88
6.2.6.1.3 Efeito da Matriz na Fonte de Ionização .....	89
6.2.6.1.4 Estudos de Recuperação Absoluta .....	90
6.2.6.1.5 Estudos de Recuperação Relativa .....	90
6.2.7 Limiares Analíticos do Método Global.....	90
6.2.8 Exatidão do Método Global .....	91
6.2.9 Incerteza Expandida do Método .....	91
6.2.10 Análise de Amostras .....	91
6.2.10.1 Ensaio em Branco .....	92
6.2.10.2 Ensaio de Recuperação .....	92
6.2.10.3 Análise de Padrões de Controlo .....	92
6.2.10.4 Critérios de Aceitação dos Resultados .....	92
6.3 Determinação Quantitativa de Fármacos por SPE-UPLC-ESI-MS/MS .....	95
6.3.1 Equipamento e Material .....	95
6.3.1.1 Equipamento .....	95
6.3.1.2 Material .....	95
6.3.2 Reagentes .....	96
6.3.2.1 Reagentes Gerais.....	96
6.3.2.2 Padrões Primários .....	96
6.3.3 Preparação de Soluções.....	96
6.3.3.1 Fase Móvel.....	96
6.3.3.2 Soluções Padrão .....	97
6.3.3.2.1 Soluções Mãe dos Fármacos .....	97
6.3.3.2.2 Solução Padrão Conjunta dos Fármacos .....	98
6.3.3.3 Soluções para a Otimização das Condições de Operação do Espectrómetro de Massa.....	98
6.3.3.3.1 Soluções Padrão Individuais para Infusões.....	98
6.3.3.4 Soluções Padrão para Validação da Gama de Trabalho.....	98
6.3.3.4.1 Soluções Padrão de Trabalho para Estudos da Linearidade em Solvente.....	98
6.3.3.4.2 Soluções Padrão de Trabalho para Estudos da Linearidade em Matriz Ajustada.....	99
6.3.4 Método Analítico SPE-UPLC-ESI-MS/MS.....	99
6.3.4.1 Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa .....	99
6.3.4.2 Condições Cromatográficas .....	100

6.3.4.3 Condições do Espectrómetro de Massa.....	101
6.3.4.3.1 Condições do “ <i>MS Method</i> ” .....	101
6.3.4.3.2 Condições de Operação da <i>Tune Page</i> .....	101
6.3.4.4 Preparação da Amostra (Extração em Fase Sólida) .....	102
6.3.5 Validação do Método Analítico UPLC-ESI-MS/MS.....	103
6.3.5.1 Testes de Linearidade.....	103
<b>Capítulo 7 – Resultados e Discussão.....</b>	<b>105</b>
7.1 Determinação Quantitativa de Pesticidas por GC/MS .....	105
7.1.1 Validação do Método Cromatográfico.....	105
7.1.1.1 Estudos de Linearidade dos Pesticidas.....	108
7.2 Determinação Quantitativa de Pesticidas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS.....	112
7.2.1 Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa.....	112
7.2.2 Validação do Método Cromatográfico.....	115
7.2.2.1 Estudos de Linearidade dos Pesticidas.....	115
7.2.2.2 Estudos de Linearidade com Padrões Internos Deuterados (“ <i>Surrogate</i> ”) ..	121
7.2.2.3 Estudos de Repetibilidade .....	126
7.2.2.4 Precisão Intermédia.....	127
7.2.2.5 Razão MRM1/MRM2 .....	128
7.2.2.6 Limiares Analíticos Instrumentais .....	129
7.2.3 Validação do Método de Preparação da Amostra .....	131
7.2.3.1 Precisão dos Ensaio de Recuperação em Diferentes Matrizes .....	131
7.2.3.2 Efeito da Matriz em diferentes níveis de concentração.....	134
7.2.3.3 Estudo do Efeito da Matriz na Fonte de Ionização .....	139
7.2.3.4 Avaliação da Recuperação Absoluta e Relativa.....	141
7.2.3.5 Avaliação das Perdas do Processo de Preparação da Amostra .....	143
7.2.4 Limiares Analíticos do Método Global.....	149
7.2.5 Exatidão do Método Global .....	150
7.2.6 Incerteza Expandida do Método .....	151
7.2.7 Análise de Amostras .....	153
7.3 Determinação Quantitativa de Fármacos por SPE-UPLC-ESI-MS/MS .....	156
7.3.1 Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa.....	156
7.3.2 Validação do Método Cromatográfico.....	159
7.3.2.1 Estudos de Linearidade dos Fármacos .....	159
<b>Capítulo 8 - Conclusões e Perspetivas Futuras .....</b>	<b>167</b>

<b>Bibliografia e Referências Bibliográficas.....</b>	<b>169</b>
---	------------

<b>Anexos.....</b>	<b>I</b>
--------------------	----------

Anexo 1 – Propriedades Físico-Químicas dos Pesticidas .....	I
---	---

Anexo 2 – Legislação Portuguesa.....	IV
--------------------------------------	----

Anexo 3 – Método dos mínimos quadrados .....	VI
--	----

Anexo 4 – Análise de Resíduos .....	IX
-------------------------------------	----

Anexo 5 – Teste das Áreas Normalizadas .....	XI
--	----

Anexo 6 – Teste de RIKILT .....	XIII
---------------------------------	------

Anexo 7 – Teste de Mandel ou Teste de <i>Fischer-Snedecor</i> .....	XV
---	----

Anexo 8 – Calibração Não Linear de 2º Grau .....	XVIII
--	-------

Anexo 9 – Cálculo de Incertezas .....	XXIV
---------------------------------------	------



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1:</b> Estrutura organizacional do setor nacional da água .....	5
<b>Figura 1.2:</b> Esquema representativo do sistema de abastecimento de água da EPAL. ....	6
<b>Figura 2.1:</b> Estrutura geral do pirrole. ....	15
<b>Figura 2.2:</b> Estrutura geral dos herbicidas triazínicos. ....	17
<b>Figura 4.1:</b> Dispositivos usualmente aplicados na extração em fase sólida .....	26
<b>Figura 4.2:</b> Etapas gerais da preparação da amostra pela técnica SPE .....	27
<b>Figura 4.3:</b> Esquema representativo do processo cromatográfico .....	31
<b>Figura 4.4:</b> Diferentes formas de picos cromatográficos. Pico gaussiano ideal (A), picos separados (B), <i>tailing</i> (C), sobreposição (D), alargamento (E), e derivada da linha de base (F). ....	35
<b>Figura 4.5:</b> Componentes da instrumentação de um cromatógrafo gasoso. ....	36
<b>Figura 4.6:</b> Sistema de injeção .....	38
<b>Figura 4.7:</b> Esquema geral de um espectrômetro de massa .....	42
<b>Figura 4.8:</b> Esquema do processo de ionização por electroionização . ....	43
<b>Figura 4.9:</b> Exemplo de um espectro de massa obtido através de electroionização .....	43
<b>Figura 4.10:</b> Representação esquemática de um analisador de massas quadrupolo .....	44
<b>Figura 4.11:</b> Esquema representativo dos principais componentes de um sistema de cromatografia líquida. ....	46
<b>Figura 4.12:</b> Curvas de Van Deemter para partículas de 10, 5, 3 e $\leq 2 \mu\text{m}$ . ....	47
<b>Figura 4.13:</b> Esquema do processo de ionização por <i>electrospray</i> . ....	49
<b>Figura 4.14:</b> Fluxo do <i>sheath gas</i> e do gás auxiliar utilizados na fonte de ionização. ....	50
<b>Figura 4.15:</b> Representação de um sistema LC-MS/MS com analisador do tipo triplo quadrupolo em modo de operação MRM/SRM .....	51
<b>Figura 4.16:</b> Modos de aquisição utilizados em analisadores do tipo triplo quadrupolo . ....	53
<b>Figura 4.17:</b> Método da adição de padrão .....	55
<b>Figura 4.18:</b> Calibração analítica com o uso de padrão interno. ....	56
<b>Figura 6.1:</b> Gradiente da fase móvel. ....	83
<b>Figura 6.2:</b> Condições da <i>tune</i> da fonte de ionização e do analisador de massa. ....	86
<b>Figura 6.3:</b> Gradiente das fases móveis para o método ácido (a) e para o método básico (b). ....	100
<b>Figura 6.4:</b> Condições da <i>tune page</i> da fonte de ionização e do analisador de massa. ....	102
<b>Figura 7.1:</b> Resposta equipamento vs tempo para os pesticidas pendimetalina e penconazol. ....	106
<b>Figura 7.2:</b> Resposta do equipamento vs tempo para o pesticida penconazol em modo de aquisição SIM dos iões 162 e 252* da pendimetalina. ....	107
<b>Figura 7.3:</b> Resposta equipamento vs tempo para o pesticida pendimetalina em modo de aquisição SIM dos iões 159* e 248 do penconazol. ....	107

<b>Figura 7.4:</b> Resposta do equipamento vs tempo para a solução padrão de trabalho P1. ....	108
<b>Figura 7.5:</b> Resposta do equipamento vs tempo para a solução padrão de trabalho P5. ....	109
<b>Figura 7.6:</b> Resposta do equipamento vs tempo para a solução padrão de trabalho P7. ....	109
<b>Figura 7.7:</b> TIC típico da solução padrão de trabalho P7 em modo SIM. ....	110
<b>Figura 7.8:</b> Otimização do íon precursor para o pesticida Metconazol. ....	112
<b>Figura 7.9:</b> Otimização dos íões produtos de maior intensidade para o pesticida Metconazol. ....	113
<b>Figura 7.10:</b> Espectro de massa do MCPA obtido no modo <i>product ion scan</i> . ....	114
<b>Figura 7.11:</b> Espectro de massa do íon precursor do MCPA obtido em modo <i>precursor ion scan</i> . .....	114
<b>Figura 7.12:</b> Cromatograma da solução padrão de trabalho P1 dos pesticidas, respeitante às transições MRM1 e respetivos tempos de retenção. ....	117
<b>Figura 7.13:</b> Cromatogramas da solução padrão de trabalho P1 para os pesticidas tebuconazol e procloraz. ....	118
<b>Figura 7.14:</b> Cromatograma da solução padrão de trabalho P1 para o pesticida ipconazol. ....	118
<b>Figura 7.15:</b> Cromatograma obtido para os padrões “ <i>surrogate</i> ” por injeção das soluções padrão de trabalho e respetivos tempos de retenção. ....	122
<b>Figura 7.16:</b> Comportamento da bentazona D6 ao longo dos dias de análises. ....	124
<b>Figura 7.17:</b> Comportamento da desetilsimazina D5 ao longo dos dias de análises. ....	125
<b>Figura 7.18:</b> Comportamento do MCPA D3 ao longo dos dias de análises. ....	125
<b>Figura 7.19:</b> Avaliação da recuperação relativa a diferentes níveis de concentração (FC 250×) – Água de Consumo Humano. ....	135
<b>Figura 7.20:</b> Avaliação da recuperação relativa a diferentes níveis de concentração (FC 250×) – Captação Superficial. ....	136
<b>Figura 7.21:</b> Avaliação da recuperação relativa a diferentes níveis de concentração (FC 250×) – Captação Subterrânea. ....	137
<b>Figura 7.22:</b> Avaliação do efeito de matriz na fonte de ionização (FC 250×). ....	140
<b>Figura 7.23:</b> Variação da intensidade de sinal do miconazol com a voltagem de cone, por <i>electrospray</i> em modo positivo. ....	157
<b>Figura 7.24:</b> Espectro de massa do miconazol obtido no modo de operação <i>product ion scan</i> . ...	158
<b>Figura 7.25:</b> Cromatograma obtido por injeção da solução padrão de trabalho equivalente ao ponto mais baixo da gama de trabalho (P1) dos fármacos no método cromatográfico ácido, respeitante às transições MRM1 e respetivos tempos de retenção. ....	161
<b>Figura 7.26:</b> Cromatograma obtido por injeção da solução padrão de trabalho equivalente ao ponto mais baixo da gama de trabalho (P1) dos fármacos no método cromatográfico básico, respeitante às transições MRM1 e respetivos tempos de retenção. ....	161
<b>Figura 7.27:</b> Curva de calibração pelo método de adição de padrão (matriz ajustada) para o fármaco fluconazol. ....	162



<b>Figura 7.28:</b> Curva de calibração pelo método de adição de padrão (matriz ajustada) para o fármaco clotrimazol.....	162
<b>Figura 7.29:</b> Curva de calibração pelo método de adição de padrão (matriz ajustada) para o fármaco miconazol. ....	163
<b>Figura 7.30:</b> Cromatograma obtido por injeção da solução padrão de trabalho equivalente ao ponto mais baixo da gama de trabalho (P1) de todos os fármacos monitorizados pelo método cromatográfico ácido, respeitante às transições MRM1 e respetivos tempos de retenção. ....	164
<b>Figura 7.31:</b> Cromatograma obtido por injeção da solução padrão de trabalho equivalente ao ponto mais baixo da gama de trabalho (P1) de todos os fármacos monitorizados pelo método cromatográfico básico, respeitante às transições MRM1 e respetivos tempos de retenção...	165



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1:</b> Lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União descrita na Decisão de Execução da Diretiva EU 2020/1161/CE .....	11
<b>Tabela 2.1:</b> Classificação dos pesticidas por alvo de ação. ....	16
<b>Tabela 3.1:</b> Principais características físico-químicas dos antifúngicos estudados .....	23
<b>Tabela 6.1:</b> Concentração das soluções mãe de pesticidas para análise por GC/MS. ....	66
<b>Tabela 6.2:</b> Concentração da solução padrão conjunta de pesticidas para análise por GC/MS. ....	67
<b>Tabela 6.3:</b> Concentração das soluções padrão de trabalho dos pesticidas para validação do método analítico por GC/MS.....	67
<b>Tabela 6.4:</b> Condições cromatográficas da análise por GC/MS. ....	68
<b>Tabela 6.5:</b> Programa de temperaturas do forno da análise por GC/MS. ....	68
<b>Tabela 6.6:</b> Condições do espectrómetro de massa. ....	69
<b>Tabela 6.7:</b> Programa de aquisição de dados no modo SIM. ....	69
<b>Tabela 6.8:</b> Fases móveis utilizada na análise cromatográfica por UPLC-MS/MS. ....	73
<b>Tabela 6.9:</b> Concentração das soluções mãe de pesticidas para a análise por UPLC-MS/MS.....	74
<b>Tabela 6.10:</b> Concentração da solução padrão conjunta de pesticidas para análise por UPLC-MS/MS. ....	75
<b>Tabela 6.11:</b> Concentração das soluções mãe dos “ <i>surrogate</i> ”. ....	76
<b>Tabela 6.12:</b> Concentração da solução padrão conjunta dos “ <i>surrogate</i> ”. ....	76
<b>Tabela 6.13:</b> Concentração da solução padrão intermédia dos “ <i>surrogate</i> ”. ....	76
<b>Tabela 6.14:</b> Concentração de cada pesticida na solução padrão intermédia para estudo da linearidade. ....	78
<b>Tabela 6.15:</b> Concentração de cada pesticida nos padrões da curva de calibração. ....	79
<b>Tabela 6.16:</b> Concentração do ponto intermédio de cada pesticida para estudo da precisão. ....	80
<b>Tabela 6.17:</b> Concentração de cada pesticida na solução padrão de fortificação ao LOQ. ....	81
<b>Tabela 6.18:</b> Condições definidas para o espectrómetro de massa.....	82
<b>Tabela 6.19:</b> Condições cromatográficas .....	83
<b>Tabela 6.20:</b> Método criado no software do equipamento para análise dos compostos por UPLC-ESI-MS/MS. ....	84
<b>Tabela 6.21:</b> Condições utilizadas pelo programa de extração por SPE para análise de pesticidas. ....	86
<b>Tabela 6.22:</b> Níveis de concentração para o estudo do efeito da matriz. ....	89
<b>Tabela 6.23:</b> Critérios de aceitação da recuperação absoluta em função da recuperação média obtida para cada pesticida (Recuperação $\pm$ 25%). ....	94
<b>Tabela 6.24:</b> Fase móvel do UPLC para análise de fármacos. ....	97
<b>Tabela 6.25:</b> Concentração das soluções mãe de fármacos para análise por UPLC-MS/MS.....	97

<b>Tabela 6.26:</b> Concentração da solução padrão conjunta de fármacos para análise por UPLC-MS/MS. ....	98
<b>Tabela 6.27:</b> Concentração de cada fármaco nas soluções padrão de trabalho para estudo da linearidade. ....	98
<b>Tabela 6.28:</b> Condições Cromatográficas.....	101
<b>Tabela 6.29:</b> Método criado no <i>software</i> do equipamento para análise dos fármacos por UPLC-ESI-MS/MS. ....	101
<b>Tabela 6.30:</b> Condições utilizadas pelo programa de extração por SPE. ....	102
<b>Tabela 7.1:</b> Tempos de retenção para cada pesticida. ....	105
<b>Tabela 7.2:</b> Tempo de retenção para os pesticidas monitorizados por GC/MS (método interno da EPAL).....	110
<b>Tabela 7.3:</b> Gama de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação para os novos pesticidas por GC/MS.....	110
<b>Tabela 7.4:</b> Resultados dos testes estatísticos para os novos pesticidas nos estudos de linearidade. ....	111
<b>Tabela 7.5:</b> Gama de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação para os pesticidas por UPLC-MS/MS.....	119
<b>Tabela 7.6:</b> Resultados dos testes estatísticos para os pesticidas nos estudos de linearidade. ....	120
<b>Tabela 7.7:</b> Gama de trabalho, equação do polinómio de grau 2, coeficiente de determinação e valor do teste de máximo e mínimo para a bentazona.....	121
<b>Tabela 7.8:</b> Gama de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação para os pesticidas pelo método do padrão interno. ....	123
<b>Tabela 7.9:</b> Estudos de linearidade dos pesticidas analisados por UPLC-MS/MS pelo método do padrão interno.....	123
<b>Tabela 7.10:</b> Gama de trabalho, equação do polinómio de grau 2, coeficiente de determinação e valor do teste de máximo e mínimo para a razão bentazona/bentazona D6. ....	124
<b>Tabela 7.11:</b> Decréscimo médio dos padrões “ <i>surrogate</i> ” ao longos dos dias de análises. ....	126
<b>Tabela 7.12:</b> Estudos de precisão instrumental do método de UPLC-MS/MS em condições de Repetibilidade (n=10).....	127
<b>Tabela 7.13:</b> Estudos de precisão intermédia do método de UPLC-MS/MS para análise de pesticidas (n=10). ....	128
<b>Tabela 7.14:</b> Variabilidade da razão MRM1/MRM2 ao longo da gama de trabalho para cada um dos compostos em estudo (n=10). ....	129
<b>Tabela 7.15:</b> Limiares analíticos instrumentais do método de UPLC-MS/MS para análise de pesticidas com base na reta de calibração, condições de repetibilidade e razão sinal/ruído. ....	130
<b>Tabela 7.16:</b> Precisão dos ensaios de recuperação para análise de pesticidas por SPE-UPLC-MS/MS em diferentes matrizes (n=6). ....	133

<b>Tabela 7.17:</b> Avaliação global da recuperação relativa a diferentes níveis de concentração (FC 250×) (n=4).....	138
<b>Tabela 7.18:</b> Percentagem da recuperação absoluta em diferentes matrizes (FC 250×) (n entre 288 e 337).....	142
<b>Tabela 7.19:</b> Percentagem da recuperação relativa em diferentes matrizes (FC 250×) (n entre 67 e 328).....	143
<b>Tabela 7.20:</b> Comparação da percentagem de recuperação nas etapas de preparação da amostra – Água Ultra Pura. ....	145
<b>Tabela 7.21:</b> Comparação da percentagem de recuperação nas etapas de preparação da amostra – Água Consumo Humano. ....	146
<b>Tabela 7.22:</b> Comparação da percentagem de recuperação nas etapas de preparação da amostra – Captação Subterrânea. ....	147
<b>Tabela 7.23:</b> Comparação da percentagem de recuperação nas etapas de preparação da amostra – Captação Superficial.....	148
<b>Tabela 7.24:</b> Limiares analíticos do método global obtidos com base na reta de calibração, condições de repetibilidade e razão sinal/ruído. ....	149
<b>Tabela 7.25:</b> Avaliação da Exatidão em ensaios interlaboratoriais (EIL 1, EIL 2 e EIL 3) por UPLC-MS/MS.....	150
<b>Tabela 7.26:</b> Incerteza expandida do método de ULPC-MS/MS para análise de pesticidas através da abordagem " <i>bottom-up</i> ". ....	152
<b>Tabela 7.27:</b> Incerteza expandida do método de ULPC-MS/MS para análise de pesticidas através da abordagem " <i>top-down</i> ". ....	153
<b>Tabela 7.28:</b> Análise de pesticidas em várias amostras por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. (n > 500)	155
<b>Tabela 7.29:</b> Gama de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação para os fármacos no método ácido e no método básico.....	159
<b>Tabela 7.30:</b> Resultados dos testes estatísticos para os fármacos nos estudos de linearidade no método ácido e no método básico.....	159
<b>Tabela 7.31:</b> Limiares analíticos instrumentais obtidos com base na reta de calibração. ....	160



## Símbolos, Siglas, Abreviaturas e Acrónimos

A – Efeito de caminho múltiplo

a – Ordenada na origem

A1 – Tipo de águas naturais destinada à produção de água para consumo humano, tratamento físico e desinfecção, por exemplo, filtração rápida e desinfecção (cloração).

A2 – Tipo de águas naturais destinada à produção de água para consumo humano, tratamento físico e químico e desinfecção, por exemplo, pré-oxidação (pré-cloração), coagulação química, decantação, filtração rápida e desinfecção (ozonização e pós-cloração).

AdP – Águas de Portugal

AdVT – Águas do Vale do Tejo

APA – Agência Portuguesa do Ambiente

AR – Análise de Resíduos

ATC – “*Anatomical Therapeutic Chemical*”, Classificação Anatômica Terapêutica Química

B – Difusão Longitudinal

b – Declive da reta de calibração

C – Resistência à transferência de massa

$C_{exp}$  – Concentração do composto na amostra fortificada

$C_{teórica}$  – Concentração teórica do composto na amostra fortificada

CI – “*Chemical Ionization*”, Ionização Química

CID – “*Collision-Induced Dissociation*”, Dissociação induzida por colisão

CV – Coeficiente de Variação

DGAV – Direção-Geral da Alimentação e Veterinária

DL – Decreto-Lei

Dp – Desvio Padrão

$d_p$  – Diâmetro médio das partículas

E – Declive (tangente) da função de calibração não linear no ponto central da gama de trabalho

EI – “*Electroionization*”, Electroionização

EIL – Ensaios Interlaboratoriais

EPAL – Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A.

ERSAR – Entidade Reguladora dos Serviços de Água e Resíduos

ESI – “*Electrospray Ionisation*”, Ionização por *electrospray*

ETA – Estações de Tratamento

ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais

EU – “*European Union*”, União Europeia

F – Valor tabelado da distribuição F de Fischer-Snedecor

FC – Fator de concentração

GC – “*Gas Chromatography*”, Cromatografia Gasosa

H – Altura equivalente a um prato teórico

HPLC – “*High performance liquid chromatography*”, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IARC – “*International Agency for Research on Cancer*”, Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

k – Fator de expansão

$k_1$  – Coeficiente de partição do primeiro pico

$k_2$  – Coeficiente de partição do segundo pico

$K_i$  – Coeficiente de distribuição ou de partição

$k_i$  – Fator de retenção

$k_{ow}$  – Coeficiente de partição octanol-água

L – Comprimento da coluna cromatográfica

LAB – Laboratórios e Controlo da Qualidade da Água

LLE – “*Liquid-Liquid Extraction*”, Extração líquido-líquido

LOD – “*Limit of Detection*”, Limite de Deteção

LOQ – “*Limit of Quantification*”, Limite de Quantificação

MALDI – “*Matrix-assisted laser desorption/ionization*”, Ionização e dessorção a laser assistida por matriz

MCPA – “*2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid*”, Ácido (4-cloro-2-metilfenoxi) acético



MDL – “*Method Detection Limit*”, Limite de Detecção do Método Global

MQL – “*Method Quantification Limit*”, Limite de Quantificação do Método Global

MRC – Materiais de Referência Certificados

MRM – “*Multiple Reaction Monitoring*”, Monitorização de Reações Múltiplas

MRM1 – Transição de quantificação

MRM2 – Transição de qualificação

MS – “*Mass Spectrometry*”, Espectrometria de Massa

MS/MS – Espectrometria em massa *tandem*

m/z – Razão massa carga

N – Número de pratos teóricos

n – Número de medições

$n_e$  – Número de moléculas que residem na fase estacionária

$n_m$  – Número de moléculas que residem na fase móvel

NIST – “*National Institute of Standards and Technology*”, Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia

NQA – Normas de Qualidade Ambientais

OMS – Organização Mundial da Saúde

P – Pressão

p.a – Pró-análise (grau analítico)

PCBs – “*Polychlorinated Biphenyl*”, Bifenilos Policlorados

PCQA – Plano de Controlo da Qualidade da Água

PEAASAR – Plano Estratégico de Abastecimento de Águas e Saneamento de Águas Residuais

PI – Padrão Interno Cromatográfico

PTFE – “*Polytetrafluoroethylene*”, Politetrafluoretileno

Q – Quadrupolo

Q1 – Primeiro quadrupolo

Q3 – Terceiro quadrupolo

QqQ – Triplo Quadrupolo

q2 – Segundo quadrupolo, célula de colisão

$R^2$  – Coeficiente de determinação da reta

$R_s$  – Resolução Cromatográfica

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMS – “*Root Mean Square*”, Raiz quadrada média

SPE – “*Solid Phase Extraction*”, Extração em Fase Sólida

SEPNA – Serviço de Proteção da Natureza e do Ambiente

SRM – “*Selected Reaction Monitoring*”, Monitorização de Reação Seleccionada

$s$  – Desvio padrão absoluto

Surrogate – Padrão interno de concentração ou padrão interno do método

$S_{x0}$  – Estimativa do desvio padrão de várias leituras do branco

$S_{y/x}$  – Desvio padrão residual da curva de calibração

SIM – “*Selected Ion Monitoring*”, Monitorização seletiva de iões

$t_r$  – Tempo de retenção

TIC – “*Total Ion Chromatogram*”, Traçado de corrente iónica

TOF – “*Time of flight*”, Tempo de voo

$t_m$  – Tempo morto

$t'_r$  – Tempo de retenção ajustado

$U$  – Incerteza expandida

UPLC – “*Ultra Performance Liquid Chromatography*”, Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

$u$  – Velocidade linear da fase móvel

$u_{ext}$  – Incerteza associada a componente da exatidão do método

$u_{padrão}$  – Incerteza associada à preparação dos padrões de calibração

$u_{prec}$  – Incerteza associada à precisão intermédia do método

$u_{reta}$  – Incerteza associada à interpolação da reta de calibração

VMA – Valor Máximo Admissível

VMR – Valor Máximo Recomendado

VT – Valor teste para o estudo de funções lineares

$x_i$  – Valor individual de uma medição

$\bar{x}$  – Média aritmética de um número  $n$  de medições

$\alpha$  – Seletividade

$\Delta L$  – Variação do valor da leitura

$\Delta C$  – Variação do valor da concentração

$\eta$  – Viscosidade da fase móvel

$\sigma^2$  – Variância do pico

$\omega$  – Largura de base do pico

$\omega_{1/2}$  – Largura do pico a meia altura

$\Phi$  – Resistência ao escoamento

## Introdução

Os meios hídricos são o principal veículo de dispersão ambiental, sendo o meio recetor de esgostos domésticos, industriais e agropecuários. Atualmente estima-se que mais de 70% da água doce seja destinada ao processo de irrigação, sendo esta a maior fonte de consumo de água no mundo.

Devido às grandes descargas de efluentes realizadas no meio hídrico, as quais possuem inúmeras substâncias químicas utilizadas no dia-a-dia, tem sido observado nas últimas décadas uma preocupação crescente sobre as consequências adversas provenientes da exposição a estes contaminantes.

Atualmente, além dos contaminantes prioritários convencionais (regulamentados), tem sido dada especial atenção aos denominados “Contaminantes Emergentes”, os quais não são regulamentados, mas apresentam grande potencial para se tornarem candidatos a futuras regulamentações.

A fim de responder a novas informações sobre os potenciais riscos relacionados com os contaminantes emergentes, a Comissão Europeia estabeleceu a criação de listas de vigilância atualizadas a cada 24 meses e com validade limitada. As substâncias presentes nessas listas de vigilância devem ser monitorizadas por um período mínimo de 12 meses por todos os estados-membros da União.

O Laboratório de Análises de Água da EPAL executa análises em rotina dos pesticidas, por LLE-GC/MS, SPE-GC/MS, SPE-HPLC-MS/MS e UPLC-MS/MS por injeção direta. Numa primeira fase de estudos, optou-se por realizar a implementação dos novos pesticidas no método SPE-GC/MS devido à vantagem da possibilidade de automatização do processo de análise, aumentando a rentabilidade do número de amostras analisadas. Entretanto, devido à falta de linearidade dos resultados obtidos e à chegada de um novo equipamento (UPLC) nas instalações da EPAL, a implementação dos novos pesticidas foi realizada por SPE-UPLC-MS/MS.

Desta maneira, o método que era antes realizado por HPLC passou a ser realizado por UPLC, pelo que foi necessária a validação não só dos novos compostos implementados, como também dos compostos que já eram analisados pelo método SPE-HPLC-MS/MS.

Em simultâneo, foi realizada também a implementação de três fármacos por SPE-UPLC-MS/MS, em um método já desenvolvido pela EPAL, que tem por objetivo estudar a possibilidade de ocorrência de fármacos nas águas captadas.

Ademais, sendo um trabalho realizado em ambiente empresarial, os estudos realizados e as opções tomadas tiveram sempre em consideração os objetivos da EPAL, que passam pela implementação em rotina dos métodos de análise e a sua posterior acreditação segundo a norma NP

EN ISO/IEC 17025. Isto implica a aplicação de vários testes, aplicação de critérios de aceitação e requisitos de controlo de qualidade interno.

Para uma melhor compreensão do trabalho, este foi organizado por capítulos, os quais representam três secções principais: secção teórica, secção experimental e uma secção relativa às conclusões do trabalho efetuado e perspetivas futuras.

Da secção teórica fazem parte os três primeiros capítulos:

O primeiro capítulo faz um breve apanhado sobre a importância de um tratamento e controlo correto das águas destinadas ao consumo humano, apresenta a organização nacional do setor da água, uma breve descrição da EPAL, e apresenta ainda um enquadramento legal, de âmbito nacional, no que se refere aos requisitos definidos para o controlo de qualidade da água de consumo.

O segundo e o terceiro capítulo introduzem o conceito, os efeitos/toxicidade, as classificações e as legislações em vigor para os pesticidas e os fármacos, respetivamente.

Da secção experimental fazem parte o quarto capítulo onde é descrita a metodologia seguida para a implementação e análise dos pesticidas e fármacos (SPE-GC/MS e SPE-UPLC-MS/MS), o quinto capítulo que trata dos parâmetros de qualidade utilizados na validação de um método analítico, o sexto capítulo que pormenoriza a parte experimental realizada em cada metodologia e o sétimo capítulo em que se apresenta as discussões e os resultados obtidos na otimização dos parâmetros, validação dos métodos, e os resultados da ocorrência de fármacos e pesticidas no sistema de abastecimento da EPAL e da AdVT.

Por fim, o oitavo capítulo resume as conclusões do trabalho realizado bem como sugestões de futuros estudos que poderão ser realizados.

## Capítulo 1 - Controlo de Qualidade da Água

### 1.1 Água

O fornecimento de água às populações constitui uma condicionante essencial para a saúde humana e desenvolvimento económico. Ao longo da história da humanidade as exigências, em qualidade e quantidade, sob a necessidade do uso da água tornaram-se crescentes, abrangendo tanto os recursos hídricos superficiais quanto subterrâneos existentes no planeta. O abastecimento de água estabeleceu assim uma relação ambígua com o ambiente: de um lado é um usuário primordial, dele dependente; de outro ao realizar este uso provoca impactos (1).

As características físicas, químicas, biológicas e radiológicas das águas naturais traduzem uma série de processos provenientes do local de captação da água, que podem ser veiculados à causa de enfermidades, causando influência direta na vida do consumidor. O controlo de todos os fatores do meio físico do homem, que exercem ou podem exercer efeito deletérios sobre seu bem-estar físico, mental ou social, inserem-se no conceito de saneamento, sendo este um conjunto de ações sobre o meio ambiente no qual vivem as populações que visa a proteção da saúde pela garantia de condições de salubridade (1,2).

O controlo dos riscos à saúde para um fornecimento adequado de água potável inicia-se com a escolha do local de captação, sendo priorizados locais livres de contaminantes naturais (substâncias húmicas, microrganismos e seus metabolitos e hidrocarbonetos aromáticos, por exemplo), e protegidos contra a contaminação de natureza química ou biológica provocada pelas mais diversas atividades antropogénicas. A intensa atividade industrial e a rapidez do lançamento de novos produtos no mercado tornam praticamente impossível a enumeração e quantificação de todos os compostos orgânicos que podem estar presentes na água. Dentro dos contaminantes orgânicos de maior prevalência e toxicidade, podem ser citados: óleos minerais, derivados de petróleo, fenóis, pesticidas, bifenilos policlorados (PCBs) e surfactantes. O controlo da qualidade da água segue-se com a conceção, o projeto e a operação adequada do tratamento da água e se completa nas demais unidades de sistema: captações, estações elevatórias, adutores, reservatórios e redes de distribuição (1,3).

É fundamental ter em mente que para além de ser um solvente universal da maioria das substâncias, modificando-as e modificando-se em função destas, a água atua também como meio de transporte permitindo que ao longo de um mesmo curso da água as características alterem-se temporal e espacialmente. Tais características configuram um carácter dinâmico na sua composição, exigindo um controlo rigoroso por parte dos órgãos responsáveis pela distribuição e abastecimento, de modo a obedecer aos requisitos exigidos na legislação implementada em vários países (2,3).

A definição clara e precisa dos objetivos de trabalho facilita a definição dos parâmetros a serem monitorizados e a escolha dos tipos de análises a serem realizadas. A monitorização da qualidade da água é um dos principais pilares para uma política de planeamento e gestão de recursos hídricos, visto que funciona como um sensor que possibilita o acompanhamento do processo de uso dos corpos hídricos, apresentando os efeitos sobre as características qualitativas das águas, visando subsidiar as ações de controlo ambiental (1).

Este trabalho possui como principal objetivo incluir e validar, em métodos de análise de contaminantes emergentes, três fármacos e nove pesticidas estabelecidos pela terceira lista de vigilância publicada pelo Jornal Oficial da União Europeia em agosto de 2020, e que devem ser monitorizados a nível da União Europeia (EU) no domínio da política da água.

O termo “contaminantes emergentes” designa compostos ainda pouco caracterizados e habitualmente libertados nos ecossistemas, que não estão regulamentados, mas que se pensa existir um risco para a saúde (ambiental, humana e animal) a depender dos resultados dos estudos sobre sua toxicidade e/ou efeito nefasto. No grupo dos contaminantes emergentes podem ser listados fármacos, produtos de cuidado pessoal, pesticidas e químicos indústrias que não são totalmente removidos das estações de tratamento de águas residuais (ETAR) (4).

## **1.2 Organização Nacional do Setor da Água**

O setor das águas subdivide-se em dois serviços distintos: o de abastecimento de água para consumo humano e o de saneamento de águas residuais urbanas.

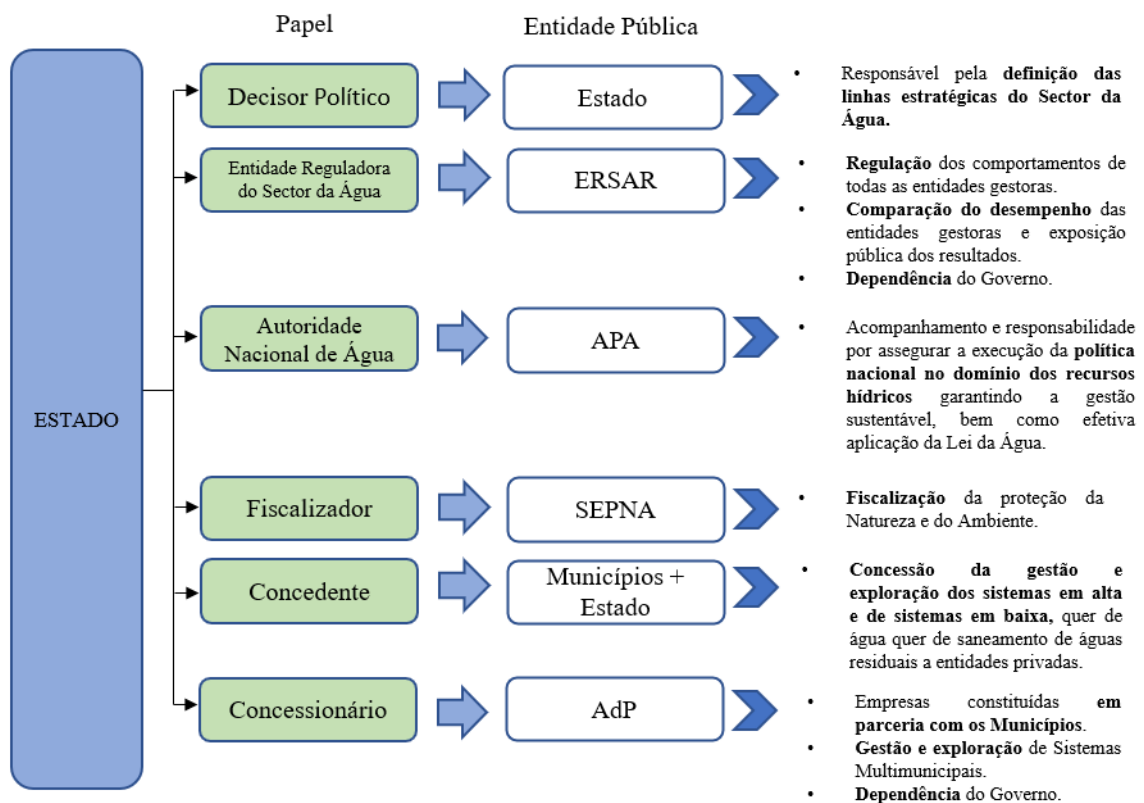
A atividade de abastecimento público de água compreende a captação, o tratamento, a elevação, o transporte, o armazenamento, a distribuição e a utilização da água. Por sua vez, a atividade de saneamento de águas residuais urbanas compreende a descarga, a drenagem, a elevação, o transporte e o tratamento das águas residuais de origem urbana, bem como a sua rejeição no meio hídrico (5). Nestas atividades, são designados sistemas em alta àqueles constituídos por um conjunto de componentes a montante da rede de distribuição de água, fazendo a ligação do meio hídrico ao sistema em baixa. Os sistemas em baixa são constituídos por um conjunto de componentes que ligam o sistema em alta ao utilizador final (6–8).

O ano de 1993 marcou uma grande reforma do setor das águas em Portugal, onde se considerou essencial implementar uma gestão empresarial de forma a garantir o desenvolvimento sustentável dos serviços de águas nacionais (7,9). Para tal, Portugal passou a ter ao seu dispor o Plano Estratégico de Abastecimento de Águas e Saneamento de Águas Residuais (PEAASAR), que define três grandes objetivos estratégicos, designadamente, (i) a universalidade, a continuidade e a qualidade do serviço, (ii) a sustentabilidade do sector e (iii) a proteção dos valores ambientais (10).

A criação de uma entidade reguladora nacional, a ERSAR (Entidade Reguladora dos Serviços de Água e Resíduos), visou assegurar uma correta proteção do utilizador dos serviços de águas através da promoção da qualidade de serviço prestado pelas entidades gestoras e da garantia da moderação dos tarifários praticados (7).

Do ponto de vista da estrutura do mercado, o setor das águas constitui um caso típico de indústria de rede, tanto ao nível da atividade em alta como ao nível da atividade em baixa, configurando a gestão destas infraestruturas situações de monopólio natural. Neste setor a escala dos monopólios é regional, na medida da abrangência geográfica de cada rede explorada. Sendo o monopólio natural uma falha de mercado, por não ser concorrencial, a regulação é uma forma de reduzir a distorção de mercado e consequentes ineficiências resultantes da existência de um monopólio natural (5).

No setor de águas e resíduos coexistem numerosos e diversificados tipos de entidades gestoras de sistemas de titularidade estatal e municipal, com diversos modelos de governo. A figura 1.1, apresenta o diagrama organizacional do setor da água em Portugal, bem como as responsabilidades de cada entidade.



**Figura 1.1:** Estrutura organizacional do setor nacional da água (adaptado de (5)).



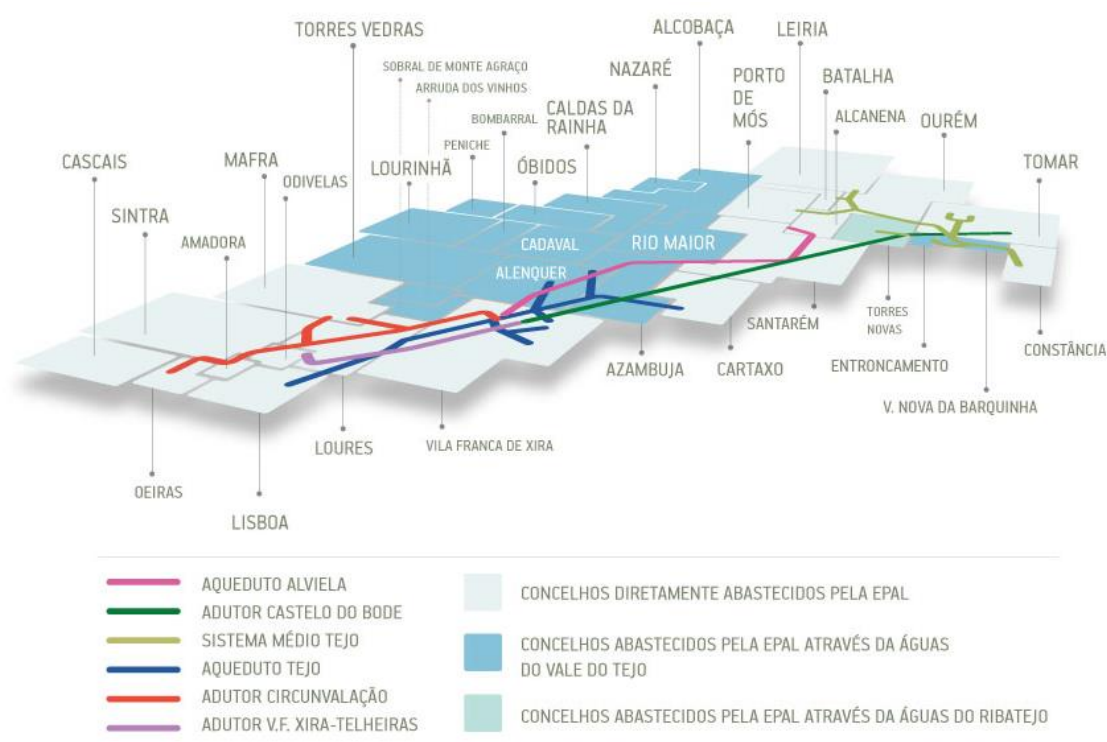
### 1.3 EPAL

A Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A. (EPAL), é uma empresa do setor empresarial do Estado, detida a 100% pela Águas de Portugal (AdP), e encontra-se orientada para a captação, produção, transporte e distribuição de água para o consumo humano. São prestados ainda serviços de análise e controlo laboratorial e monitorização de redes de distribuição. Atualmente o mercado da EPAL na prestação dos serviços de abastecimento compreende uma área de 7.095 km<sup>2</sup>, os quais abrangem 35 municípios envolvendo aproximadamente 2,8 milhões de consumidores (11).

A EPAL é a maior empresa nacional no setor de abastecimento de água e a maior empresa do Grupo Águas de Portugal, apresentando uma captação de água anual de 219,5 milhões de metros cúbicos.

No presente momento a EPAL gere e explora um sistema de abastecimento que integra três subsistemas: o de Castelo do Bode, o do Tejo e o do Alviela. Dos três subsistemas referidos o maior e mais relevante é o do Castelo do Bode, representando hoje cerca de 75% da capacidade de produção da empresa (11).

Na figura 1.2, encontra-se um esquema representativo do sistema de abastecimento de água da EPAL.



**Figura 1.2:** Esquema representativo do sistema de abastecimento de água da EPAL.

De modo a garantir a qualidade da água em toda a extensão do sistema de abastecimento até à torneira do consumidor, tendo em conta o cumprimento da legislação em vigor, a proteção da saúde do consumidor e o nível de segurança prestado, a direção de Laboratórios e Controlo da Qualidade da Água (LAB) é o órgão da EPAL que tem a responsabilidade de proceder à conceção, implementação e gestão do Plano de Controlo da Qualidade da Água (PCQA) no Sistema de Abastecimento da EPAL (11,12).

### **1.3.1 Programa de Monitorização da Qualidade da Água no Sistema de Abastecimento da EPAL**

A Direção de Controlo da Qualidade da Água da EPAL é constituída por dois laboratórios (Laboratório de Análises da Água de Lisboa e Laboratório de Vale da Pedra), que possuem a responsabilidade de proceder à conceção, implementação e gestão do PCQA, aplicando-se o princípio de que a responsabilidade pelo controlo da qualidade do produto deve ser independente das atividades de produção e de exploração do sistema de abastecimento de água.

O Laboratório de Análises da Água de Lisboa está acreditado desde 1999, segundo a Norma NP EN ISO/IEC 17025 – “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração”, e o Laboratório de Vale da Pedra desde 2008, para as seguintes atividades: colheita, preservação e transporte de amostras de água; análise de 110 parâmetros da qualidade da água; 135 métodos analíticos para ensaio em águas; e testes a materiais orgânicos em contacto com água para consumo humano (12).

Tendo como objetivos fundamentais comprovar o nível de qualidade da água *versus* cumprimento da legislação em vigor e detetar possíveis anomalias ocasionais ou de carácter sistemático permitindo que sejam postas em prática medidas preventivas eficazes, a gestão da qualidade da água no sistema de abastecimento da EPAL integra as seguintes componentes distintas de controlo (12,13):

- Controlo em contínuo de parâmetros de qualidade da água, como: alcalinidade, alumínio, cloro, condutividade, dureza total, pH, temperatura e turvação;
- Plano de controlo da qualidade da água no sistema de abastecimento da EPAL;
- Controlo complementar da qualidade da água, através de campanhas extraordinárias no âmbito de solicitações internas decorrentes, tratamento de reclamações da qualidade de água, controlo da eficácia de operações de lavagem e desinfeção de condutas e reservatórios, tratamento de incumprimento de valores paramétricos, implementação da análise de parâmetros da qualidade da água não obrigatórios na legislação nacional, entre outros.

O PCQA é aprovado anualmente pelo conselho de administração da EPAL, e realiza controlo de qualidade das águas provenientes de diversas origens que são utilizadas para consumo humano, a fim de avaliar a evolução da qualidade da água bruta e rastrear eventuais resultados anómalos ao longo do seu sistema de captação, tratamento, transporte e abastecimento. Nas Estações de Tratamento (ETA) são também realizados controlos do processo e dos produtos químicos utilizados (12).

Os estudos realizados neste trabalho nas várias etapas propostas levaram em consideração os objetivos da EPAL, passando assim pela implementação em rotina dos métodos de análise validados e a sua posterior acreditação segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025. Isto implica a realização de vários testes, aplicação de critérios de aceitação e requisitos de controlo de qualidade interno.

## 1.4 Enquadramento Legal

Em Portugal, o controlo da qualidade da água de consumo é realizado em cumprimento dos requisitos definidos no Decreto-Lei n.º 152/2017 (8), de 7 de dezembro, que substituiu o anterior diploma legal, o Decreto-Lei n.º 306/2007 (6), de 27 de agosto. Este decreto-lei entrou em vigor no dia 1 de janeiro de 2018, e define novas regras sobre o controlo da qualidade da água para consumo humano e novos parâmetros, reforçando que os laboratórios que realizam análises da água devem trabalhar de acordo com os procedimentos aprovados a nível internacional e utilizar métodos validados. Com este decreto-lei pretende-se adaptar o controlo da qualidade da água à evolução dos últimos dez anos, garantindo a análise das informações sobre as captações de água para consumo humano e assegurando que existam medidas do controlo de segurança ao longo de toda a cadeia de abastecimento de água.

A responsabilidade pela implementação e fiscalização do diploma é atribuída à ERSAR, criada como o estatuto de autoridade competente para a qualidade da água de consumo humano, que define as atribuições e competências das entidades gestoras dos sistemas de abastecimento público nomeadamente no que concerne a (8):

- Obrigatoriedade de um adequado tratamento de água destinado ao consumo humano;
- Verificação da conformidade do controlo da qualidade da água;
- Controlo dos parâmetros conservativos e dos pesticidas;
- Elaboração, aprovação e implementação, no início de cada ano civil, de um PCQA;
- Divulgação dos dados da qualidade da água, bem como dos incumprimentos dos valores paramétricos estabelecidos no decreto-lei;
- Garantia da melhoria contínua da qualidade da água fornecida, através de programas de controlo operacional para todos os sistemas de abastecimento;

— Critérios de aptidão aos laboratórios de ensaio.

Os parâmetros químicos de qualidade obrigatórios e respetivos valores paramétricos aplicáveis à água para consumo humano, presentes no Decreto-lei n.º 152/2017, estão listados no anexo 2.

## 1.5 Lista de Vigilância

A Diretiva 2000/60/CE (14) do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro de 2000, estabelece uma estratégia contra a poluição da água que envolve a identificação de substâncias prioritárias entre aquelas que representam um risco significativo para o ambiente aquático ou através dele a nível da União Europeia. A primeira lista contendo 33 substâncias ou grupos de substâncias prioritárias foi estabelecida em novembro de 2001 pela decisão número 2455/2001/CE (15).

No desenvolvimento de uma política económica, preventiva e de controlo da poluição química das águas superficiais, foram levados em consideração fatores científicos, ambientais e socioeconómicos, incluindo a revisão da lista de substâncias prioritárias de acordo com o artigo 16.º, n.º 4, da Diretiva 2000/60/CE (14).

Os dados de monitorização juntamente com dados sobre efeitos ecotoxicológicos e toxicológicos, de alta qualidade, são necessários para as avaliações do risco que apoiam a seleção de novas substâncias prioritárias. Infelizmente, os dados de monitorização recolhidos junto dos Estados-Membros, são particularmente escassos para muitos contaminantes emergentes, que podem ser definidos como contaminantes atualmente não incluídos nos programas de monitorização de rotina a nível da União Europeia, mas que podem representar um risco significativo que requer regulamentação, dependendo dos seus potenciais efeitos ecotoxicológicos e toxicológicos e dos seus níveis no ambiente aquático (16).

A fim de melhorar a base de informação para a futura identificação de substâncias prioritárias, em particular no que se refere a contaminantes emergentes, foram atribuídas competências de execução à Comissão no que diz respeito ao estabelecimento e atualização de uma lista de vigilância dinâmica e de validade limitada, a fim de responder a novas informações sobre os riscos potenciais colocados por contaminantes emergentes e evitar a monitorização de substâncias por mais tempo do que o necessário, sendo esta lista atualizada em intervalos de 24 meses. Ao atualizar a lista, a Comissão deve retirar da mesma qualquer substância em relação à qual possa ser efetuada uma avaliação do risco nos termos do artigo 16º, nº 2, da Diretiva 2000/60/CE sem necessidade de dados de monitorização adicionais (14).

Os Estados-Membros devem monitorizar cada substância constante da lista de vigilância em estações de monitorização representativas durante um período mínimo de 12 meses. Para cada

substância constante das listas subsequentes, os Estados-Membros devem iniciar a monitorização no prazo de seis meses a contar da sua inclusão na lista. A duração de um período de monitorização contínuo de uma substância específica constante da lista de vigilância não pode exceder quatro anos (16,17).

A primeira lista de vigilância de substâncias foi estabelecida na Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão e compreendeu dez substâncias ou grupos de substâncias, juntamente com a indicação das matrizes de monitorização, dos eventuais métodos de análise, não implicando custos excessivos, bem como dos limites de deteção máximos aceitáveis. Esta primeira lista foi atualizada em 2018, por via da Decisão de Execução (UE) 2018/840 da Comissão, tendo sido retiradas cinco substâncias e incluídas três, totalizando um total de oito substâncias ou grupos de substâncias. Por conseguinte, a obrigação de monitorizar continuamente as cinco substâncias ou grupos de substâncias que constam da lista de vigilância desde 2015, nomeadamente o 17-alfa-Etinilestradiol (EE2), o 17-beta-Estradiol (E2) e a estrona (E1), o grupo de antibióticos da família dos macrólidos, o metiocarbe e o grupo dos neonicotinoides, cessou em 2019. Relativamente às outras três substâncias constantes da lista de vigilância, nomeadamente a metaflumizona, a amoxicilina e a ciprofloxacina, a Comissão concluiu que a monitorização realizada desde 2018 não permitiu obter uma quantidade suficiente de dados de monitorização de elevada qualidade, pelo que essas substâncias permaneceram na lista de vigilância.

Em 2019, a Comissão recolheu dados sobre uma série de outras substâncias que poderiam ser incluídas na lista de vigilância. Não foram consideradas substâncias sobre as quais existam dúvidas, quer da sua toxicidade quer sobre a sensibilidade, fiabilidade ou comparabilidade dos métodos de monitorização disponíveis, ou que não fossem adequadas. Identificaram-se como candidatos adequados o antibiótico sulfametoxazol do grupo das sulfonamidas e o antibiótico trimetoprim do grupo das diaminopirimidinas, o antidepressivo venlafaxina e o seu metabolito O-desmetilvenlafaxina, um grupo de compostos azólicos, constituído por três fármacos (clotrimazol, fluconazol e miconazol) e sete pesticidas (imazalil, ipconazol, metconazol, penconazol, procloraz, tebuconazol, tetraconazol), e os fungicidas famoxadona e dimoxistrobina (17).

Em conformidade com o artigo 8º-B, nº 1, da Diretiva 2008/105/CE, a Comissão identificou eventuais métodos de análise para as substâncias propostas. O limite de deteção dos métodos deve ser, para cada substância, incluindo cada uma das substâncias integradas num grupo, pelo menos tão baixo quanto a concentração previsivelmente sem efeitos da substância na matriz correspondente (17). A lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União encontra-se na figura 1.3.

**Tabela 1.1:** Lista de vigilância das substâncias a monitorizar a nível da União descrita na Decisão de Execução da Diretiva EU 2020/1161/CE (17).

Nome da substância/do grupo de substâncias	Número CAS <sup>(1)</sup>	Número UE <sup>(2)</sup>	Método analítico indicativo <sup>(3)</sup> <sup>(4)</sup>	Limite de deteção máximo aceitável do método (ng/l)
Metaflumizona	1 399 68-49-3	604-167-6	LLE, LC-MS-MS ou SPE, LC-MS-MS	65
Amoxicilina	26787-78-0	248-003-8	SPE, LC-MS-MS	78
Ciprofloxacina	85721-33-1	617-751-0	SPE, LC-MS-MS	89
Sulfametoxazol <sup>(5)</sup>	723-46-6	211-963-3	SPE, LC-MS-MS	100
Trimetoprim <sup>(5)</sup>	738-70-5	212-006-2	SPE, LC-MS-MS	100
Venlafaxina e O-desmetilvenlafaxina <sup>(6)</sup>	93413-69-5 93413-62-8	618-944-2 700-516-2	SPE, LC-MS-MS	6
Compostos azólicos <sup>(7)</sup>			SPE, LC-MS-MS	
Clotrimazol	23593-75-1	245-764-8		20
Fluconazol	86386-73-4	627-806-0		250
Imazalil	35554-44-0	252-615-0		800
Ipconazol	125225-28-7	603-038-1		44
Metconazol	125116-23-6	603-031-3		29
Miconazol	22916-47-8	245-324-5		200
Penconazol	66246-88-6	266-275-6		1 700
Procloraz	67747-09-5	266-994-5		161
Tebuconazol	107534-96-3	403-640-2		240
Tetraconazol	112281-77-3	407-760-6		1 900
Dimoxistrobina	149961-52-4	604-712-8	SPE, LC-MS-MS	32
Famoxadona	131807-57-3	603-520-1	SPE, LC-MS-MS	8,5

<sup>(1)</sup> Chemical Abstracts Service.<sup>(2)</sup> Número da União Europeia.<sup>(3)</sup> Para assegurar a comparabilidade dos resultados provenientes de diferentes Estados-Membros, todas as substâncias devem ser monitorizadas em amostras integrais de água.<sup>(4)</sup> Métodos de extração:

LLE — extração líquido-líquido;

SPE — extração em fase sólida.

Métodos analíticos:

LC-MS-MS — Cromatografia em fase líquida-espetrometria de massa de triplo quadripolo (em tandem).

<sup>(5)</sup> O sulfametoxazol e o trimetoprim devem ser analisados em conjunto nas mesmas amostras, mas as suas concentrações devem ser individualizadas nos relatórios.<sup>(6)</sup> A venlafaxina e a O-desmetilvenlafaxina devem ser analisadas em conjunto nas mesmas amostras, mas as suas concentrações devem ser individualizadas nos relatórios.<sup>(7)</sup> Os compostos azólicos devem ser analisados em conjunto nas mesmas amostras, mas as suas concentrações devem ser individualizadas nos relatórios.



## Capítulo 2 - Pesticidas

### 2.1 Nota Introdutória

O surgimento da agricultura está relacionado ao aparecimento de comunidades sedentárias. O ser humano, ao inventar os métodos de agricultura, deixou de depender dos recursos que se encontravam ao seu redor para começar a produzir os seus próprios alimentos. No entanto, o crescimento da população e a limitação dos recursos básicos tornou a prática da agricultura um dos maiores desafios mundiais, atendendo à premissa de que para reduzir a fome é necessário o aumento da produção de alimentos. Além de ser essencial à vida humana, a agricultura depende de inúmeros fatores dificilmente controláveis, como o clima, as pragas e as doenças emergentes, que podem devastar as culturas (18).

Uma das ferramentas que nos permite utilizar os recursos naturais de forma mais eficiente, sem a perda da safra para pragas e doenças, são as substâncias ou mistura de substâncias conhecidas como pesticidas (18). Na agricultura os pesticidas são utilizados para matar pragas, incluindo insetos, roedores, fungos e plantas indesejáveis (ervas daninhas). Porém, o valor dos pesticidas vai além da agricultura. Muitas doenças transmitidas por carraças e insetos (febre amarela, encefalite, malária, entre outras) hoje são controladas pelo uso de inseticidas.

Segundo a OMS, mais de 1000 pesticidas diferentes são usados em todo o mundo (19). Entretanto é necessário o entendimento dos riscos que o seu uso pode causar.

#### 2.1.1 Toxicidade dos Pesticidas

Apesar dos resultados benéficos do uso de pesticidas, o seu uso também é prejudicial à saúde pública e ambiental. Devido à sua alta atividade biológica e toxicidade, os pesticidas ocupam uma posição única entre os contaminantes ambientais. A maioria dos pesticidas não distingue entre pragas e outras formas de vida, sendo potencialmente prejudiciais a humanos, animais, outros organismos vivos e ao ambiente se usados de maneira incorreta. Estima-se que cerca de 500 mil a 1 milhão de pessoas são envenenadas todos os anos por pesticidas, sendo na sua maioria trabalhadores agrícolas (20).

Os pesticidas são adsorvidos pelo corpo humano através da inalação, exposição oral e exposição dérmica. Essas substâncias ao serem pulverizadas sobre os alimentos, especialmente frutas e vegetais, podem reter-se no solo e serem transportadas para as águas subterrâneas, acarretando em contaminação, em consequência da água excessiva proveniente de chuvas e irrigação.



No que diz respeito aos efeitos prejudiciais à saúde humana, a toxicidade desses produtos químicos depende da sua natureza, das vias de exposição, da dose e do organismo. Essa toxicidade pode ser aguda ou crônica, sendo a toxicidade aguda a capacidade de uma substância de causar efeitos prejudiciais que se desenvolvem rapidamente após absorção, e a toxicidade crônica a capacidade de uma substância de causar efeitos adversos à saúde resultantes de exposição a longo prazo, especialmente devido a alimentos e água contaminados (20).

Envenenamentos por pesticidas sejam agudos não intencionais ou autoinfligidos (suicidas) constituem um grave problema de saúde pública em muitas partes do mundo. Apesar dos dados disponíveis serem muito limitados a estimar os impactos globais, o envenenamento por ingestão evitável de pesticida foi estimado em 186.000 mortes em 2002. O perigo agudo é altamente variável a depender do pesticida (21).

A exposição crônica a pesticidas altamente perigosos pode resultar em efeitos na pele, olhos, sistema nervoso, sistema cardiovascular, trato gastrointestinal, fígado, rins, sistema reprodutivo, sistema endócrino e sangue. Embora a evidência seja menos clara, alguns pesticidas altamente perigosos também podem afetar o sistema imunológico, e alguns pesticidas podem causar cancro, incluindo cancro infantil (21).

A Agência Internacional de Pesquisa em Cancro (IARC) juntamente com outros institutos publicou um estudo sobre o aumento de leucemia e outros tipos de cancro infantil proveniente da exposição de trabalhadores agrícolas a pesticidas e outros contaminantes agrícolas. Foi observado um elevado risco de desenvolvimento da leucemia mieloide aguda para os pais expostos a pesticidas totais e fungicidas (22,23).

No que concerne ao meio ambiente, os pesticidas além de afetar as pragas, podem também afetar predadores naturais como minhocas e polinizadores causando perda indireta nas lavouras devido à falta dos mesmos. Podem ainda ser citados a perda da biodiversidade e impactos no solo, água e ar (20).

#### **2.1.1.1 Desreguladores Endócrinos**

Desregulador endócrino é o termo que designa toda a substância ou mistura de substâncias exógenas que interfere na síntese, secreção, transporte, ligação, ação ou desenvolvimento e/ou comportamento dos organismos. Os desreguladores endócrinos são substâncias muito investigadas devido aos seus efeitos no meio ambiente e aos possíveis efeitos adversos aos organismos expostos em concentrações realmente baixas. Seus efeitos podem ser agudos ou crônicos, a depender do tempo de exposição, concentração, modo de contacto e tipo de degradação, interferindo no padrão hormonal dos órgãos reprodutores e promovendo a queda na fertilidade e até infertilidade.

Na sua maioria, estas substâncias são contaminantes químicos, provenientes de pesticidas, plásticos, detergentes, tintas e outros materiais que constituem os normais resíduos domésticos e industriais, sendo compostos muito estáveis e persistentes no meio ambiente, acumulando-se no solo e nos sedimentos de rios, sendo facilmente transportados de suas fontes até longas distâncias (24,25).

Os pesticidas organoclorados, organofosforados e triazínicos (pormenorizados na próxima secção), estão incluídos no grupo dos desreguladores endócrinos, o que torna a monitorização destes compostos em água, e outras matrizes, de vital importância (25).

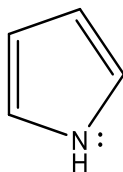
### 2.1.2 Classificação dos Pesticidas

Como o termo pesticidas engloba uma coleção distinta de substâncias com grande diversidade de substâncias ativas, toxicidade e organismos alvos, os pesticidas podem ser classificados sob diversos aspetos. As classificações mais comuns levam em conta o modo de ação, a estrutura química, os alvos de ação e a classe química.

Quanto ao **modo de ação** os pesticidas podem ser divididos em sistémicos ou não sistémicos. Os pesticidas não sistémicos têm ação por contato (via dérmica), ingestão, penetração e fumegante (via respiratória). Os pesticidas sistémicos surgiram como um aperfeiçoamento dos anteriores com a intenção de não matar os insetos não nocivos, sendo seletivo no combate a pragas (26).

Quanto à **estrutura química**, os pesticidas são classificados como compostos inorgânicos e orgânicos, sendo ainda divididos em sintéticos, quando produzidos pelo homem, e naturais. De referir que quando se encontram estruturalmente relacionados com um anel de cinco membros denominado pirrole, onde, um ou mais átomos de carbono do anel pentagonal são substituídos por heteroátomos que podem ser um azoto adicional, oxigénio ou enxofre, estes podem ser classificados como compostos azólicos.

Se a estrutura do composto azólico apresentar dois átomos de azoto, o composto resultante é denominado imidazol. Caso haja a presença de 3 átomos de azoto, o composto é denominado triazol (27). A estrutura do pirrole pode ser observada na figura 2.1.



**Figura 2.1:** Estrutura geral do pirrole.

Os compostos azólicos são amplamente usados na área medicinal, alimentar ou agrícola contra fungos patogénicos. São utilizados também na indústria de materiais, onde são adicionados a uma variedade de produtos, como tintas e revestimentos que previnem o crescimento de fungos (27).

Outra forma de classificação é dada pelo seu **alvo de ação**, sendo classificados de acordo com o organismo que combatem (26). A tabela 2.1 mostra a classificação de alguns pesticidas de acordo com o seu organismo alvo.

**Tabela 2.1:** Classificação dos pesticidas por alvo de ação.

<b>Designação</b>	<b>Organismo Alvo</b>
Fungicidas	Fungos
Inseticidas	Insetos
Herbicidas	Ervas Daninhas
Bactericidas	Bactérias
Algicidas	Algas

Quanto à **classe química**, os pesticidas podem agrupar-se em classes de substâncias cujo princípio ativo é formado por estruturas moleculares semelhantes. Sendo os inseticidas, herbicidas e fungicidas os grupos de pesticidas cuja utilização é mais expressiva. De seguida, estes grupos serão descritos em pormenor (26).

### 2.1.2.1 Inseticidas

A atividade inseticida de alguns compostos de ocorrência natural, como a nicotina e piretro, derivados respetivamente da planta do tabaco e certa espécie de crisântemo, é conhecida há séculos. Desde então, estes têm sido suplementados por compostos inorgânicos para controlo de insetos, e enxofre e compostos à base de cobre para controlo de fungos (28).

Nos anos entre 1939 e 1953, a descoberta da atividade inseticida de uma série de compostos orgânicos sintéticos, tais como organoclorados, organofosforados e carbamatos, permitiram tremendos avanços no controlo de insetos (28).

Os inseticidas organoclorados, tal como o nome sugere, possuem átomos de carbono e cloro em sua estrutura, e foram os primeiros a serem desenvolvidos, sendo caracterizados por sua elevada estabilidade química e alta persistência no meio ambiente. São pouco solúveis em água, relativamente inertes frente a ácidos e bases, e devido a exposição solar sofrem reações químicas formando compostos de estabilidade similar ou até maior que os compostos de origem (29).

Os organofosforados são compostos que apresentam átomos de fósforo na sua estrutura, e passaram a ser muito utilizados por se mostrarem extremamente eficazes contra uma ampla variedade

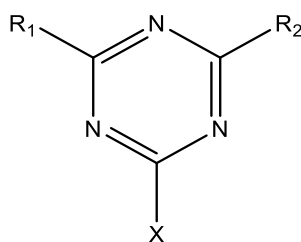
de pragas. Além disso, constituem pesticidas mais práticos, pois degradam-se rapidamente no meio ambiente, causando um impacto ambiental menos significativo (30).

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico ( $\text{H}_2\text{NCOOH}$ ) e constituem o grupo mais versátil de pesticidas. O modo de ação dos carbamatos é semelhante ao dos inseticidas organofosforados, com a vantagem de serem mais rapidamente degradados, o que diminui a sua toxicidade para os mamíferos (26).

### 2.1.2.2 Herbicidas

Os herbicidas são produtos químicos utilizados na agricultura para ervas daninhas, podendo ser seletivos ou não seletivos. A seletividade dos herbicidas é a base para o sucesso do controle químico de ervas daninhas na produção agrícola. Quanto maior a diferença de tolerância entre a cultura e a planta daninha, maior a segurança de aplicação (31). Os herbicidas geralmente inibem a atividade de uma enzima/proteína da célula e, como consequência, desencadeiam uma série de eventos que matam ou inibem o desenvolvimento da célula e do organismo (31).

Das várias classes de herbicidas pode destacar-se as triazinas, que possuem na sua estrutura um anel de seis lados, contendo três átomos de azoto e três átomos de carbono. São compostos polares, ligeiramente ácidos e de elevada estabilidade devido à configuração do seu anel heterocíclico representado na figura 2.2.



**Figura 2.2:** Estrutura geral dos herbicidas triazínicos.

Devido ao facto de serem utilizados em grandes quantidades, os herbicidas triazínicos são alvo de preocupações significativas em virtude da sua elevada persistência.

### 2.1.2.3 Fungicidas

Os fungicidas são compostos químicos de origem sintética ou natural, podendo ser utilizados quer como agentes protetores da planta contra a invasão de patógenos, quer para erradicar infeções

já estabelecidas. Alguns compostos químicos não matam os fungos, mas inibem o seu crescimento temporariamente. Tais compostos são chamados de fungistáticos. A classe dos fungicidas pode ser composta por um grupo heterogêneo de compostos químicos que incluem compostos inorgânicos como o enxofre ou o sulfato de cobre, compostos arilo, ftalimidas, entre outros (26).

## 2.2 Pesticidas Homologados

Para proceder à seleção e ao uso dos pesticidas, é indispensável o conhecimento das características dessas substâncias no que concerne ao risco que as mesmas podem causar. Há 54 anos, em Portugal, a homologação dos pesticidas agrícolas pelo Decreto-Lei 47802 de 19 de Junho de 1967, tornou-se obrigatória e contribuiu de forma decisiva para o progresso das atividades de investigação e extensão dos organismos centrais e regionais do Ministério da Agricultura, na área de proteção das plantas e das empresas produtoras de pesticidas (32).

Ao abrigo do artigo 12.º do Decreto-Lei n.º 306/2007 (6), de 27 de agosto, alterado pelo artigo 2.º do Decreto-Lei n.º 152/2017 (8), de 7 de Dezembro, e no que diz respeito aos pesticidas, as entidades gestoras devem controlar pesticidas cuja presença seja provável numa determinada zona de abastecimento, tendo em conta a localização das suas origens de água.

No âmbito do PCQA, a EPAL realiza a monitorização de pesticidas homologados e pesticidas cujo uso apesar de ser proibido possui uma elevada persistência no ambiente mesmo após anos da proibição da sua aplicação (33).

No anexo 1, encontram-se as principais características físico-químicas de todos os pesticidas estudados no presente trabalho.

## 2.3 Legislação em Vigor

Na comunidade europeia, a legislação aplicável às águas superficiais, subterrâneas e para consumo humano, de maneira a avaliar a qualidade da água, abrange um elevado número de parâmetros organoléticos, físico-químicos e microbiológicos.

Como citado anteriormente, o controlo da qualidade da água de consumo é realizado em cumprimento dos requisitos definidos no Decreto-Lei n.º 152/2017, de 7 de dezembro. Este decreto-lei estabelece em  $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$  o limite máximo admissível de qualquer pesticida na água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição, por fontanários não ligados à rede de distribuição, em pontos de entrega a outros municípios, por camiões ou navios-cisterna, por

reservatórios não ligados à rede de distribuição, ou utilizada numa empresa da indústria alimentar. Já a soma de todos os pesticidas detetados e quantificados durante o controlo da qualidade da água não deve ultrapassar o valor de  $0,5 \mu\text{gL}^{-1}$  (8).

O Decreto-Lei 236/98 de 1 de agosto, estabelece normas, critérios e objetivos de qualidade com o objetivo de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função do seu principal uso. Este diploma regula que as águas subterrâneas destinadas à produção de água para consumo humano, classificada na categoria A1, apresentem um valor máximo admissível de  $1,0 \mu\text{gL}^{-1}$  para a soma dos pesticidas totais (34). Os valores paramétricos dos decretos acima citados podem ser observados no anexo 2.

Em relação as águas superficiais, o Decreto-Lei nº. 103/2010 (35), de 24 de setembro, revogado pelo Decreto-lei nº 218/2015 (36), de 7 de outubro, estabelece normas de qualidade ambientais (NQA) para as substâncias prioritárias e para outros contaminantes. Quanto aos pesticidas em estudo, a obrigatoriedade de monitorização é referida apenas para o diurão e o isoproturão, indicando uma concentração máxima admissível de  $1,8 \mu\text{gL}^{-1}$  e  $1,0 \mu\text{gL}^{-1}$ , respetivamente (16).



## Capítulo 3 – Fármacos

### 3.1 Notas Introdutórias

Um fármaco pode ser definido como qualquer substância química destinada ao uso da cura, tratamento ou prevenção de doenças. Os fármacos são substâncias altamente ativas e são consumidos em montantes elevados, representando um problema em termos de quantidade e qualidade das emissões durante o respetivo fabrico, utilização e eliminação.

A União Europeia (UE) é considerada a segunda maior consumidora de medicamentos de uso humano e veterinário do mundo depois dos Estados Unidos. Embora inúmeros benefícios de um uso responsável dessas substâncias sejam reconhecidos, existe uma preocupação crescente sobre os potenciais efeitos adversos da presença de tais substâncias no meio ambiente e na saúde humana (37).

A maior fonte de entrada de produtos farmacêuticos no meio ambiente varia consoante o destino de uso do fármaco. Estes chegam ao ambiente, maioritariamente, através da descarga de efluentes das ETARs, da dispersão de estrume animal, e da aquacultura, onde fármacos são muitas vezes administrados com a alimentação animal (38).

As taxas de metabolização dos fármacos no organismo humano são muito variáveis, com valores entre os 5% e 90% e consequentemente, as quantidades de princípio ativo excretado na urina na sua forma original são muito diversificadas. Nas estações de tratamento de águas residuais (ETARs), estes fármacos podem estar sujeitos a modificações, resultantes do tipo de tratamento realizado e consequentemente, os efluentes podem apresentar maior ou menor quantidade de fármacos (38).

#### 3.1.1 Efeitos no Ambiente

Nas últimas décadas, inúmeros estudos relataram a presença de uma grande variedade de fármacos nas águas residuais (39), superficiais (40), subterrâneas, águas de consumo humano (41,42), nos solos (43) e nos tecidos animais (44). Uma vez no ambiente, os fármacos podem permanecer no seu compartimento inicial ou ser transferido para outro, como por exemplo, da água para os sedimentos, ou dos solos para a água. Esta transferência depende de vários fatores como a natureza da molécula, polaridade, comportamento de absorção ou de adsorção, pH, teor de matéria orgânica, teor de oxigénio e propriedades aeróbias, incluindo a extensão da degradação e as características do ambiente recetor (45).



A maioria dos fármacos são concebidos para atuar a baixas concentrações, para que possam ser tolerados pelo corpo humano ou animal, e para durar o tempo suficiente de modo a ter o efeito pretendido. Os fármacos que persistem no ambiente e se espalham pelas águas e solos ou que se acumulam nas plantas ou vida selvagem, podem constituir um risco devido à sua toxicidade.

Até ao momento, não foram estabelecidas quaisquer relações evidentes entre fármacos presentes no meio ambiente e os impactos diretos na saúde humana. Entretanto, estudos realizados demonstraram efeitos diretos na vida selvagem. Por exemplo, o analgésico diclofenac tem sido detetado em peixes e lontras, e causou a morte de alguns abutres na Ásia, expostos ao medicamento através das carcaças do gado tratado com o mesmo. Estudos têm constatado ainda que peixes machos expostos a concentrações ínfimas do componente principal da pílula contraceptiva podem tornar-se feminizados como resultado dos seus efeitos no sistema endócrino, afetando assim a capacidade da população de reprodução (38).

### 3.1.2 Classificação dos Fármacos

A classificação dos fármacos adotada neste trabalho está de acordo com a classificação farmacoterapêutica dos medicamentos aprovada pelo despacho n.º 2977/2014, de 13 de fevereiro de 2014, do Secretário de Estado da Saúde, publicado no Diário da República, 2.ª série, n.º 37, de 21 de fevereiro, estabelecendo a sua correspondência com a classificação *Anatomical Therapeutic Chemical* (ATC) da OMS. Esta classificação é adotada em instrumentos oficiais de apoio à prescrição, bem como nos processos de autorização de introdução no mercado de medicamentos e nos instrumentos normativos em matéria de comparticipação do estado no preço dos medicamentos (46).

A classificação dos medicamentos é efetuada de acordo com uma sistematização agrupada em função da identidade, entre eles, e das indicações terapêuticas para que são aprovados e autorizados, permitindo aos profissionais de saúde uma melhor e mais rápida identificação desses produtos, face às terapêuticas a que se destinam (46).

Segundo a Infarmed (Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde), os fármacos clotrimazol, miconazol e fluconazol são classificados como antifúngicos e pertencem ao grupo dos fármacos anti-infecciosos com atuação em vários sistemas, nomeadamente, aparelho digestivo, geniturinário, dérmico e sistema ocular.

Estes três fármacos possuem mecanismos de ação similares, pois atuam como inibidores da síntese do ergosterol (componente da membrana celular dos fungos), evitando a replicação das células fúngicas. Esses compostos apresentam ainda na sua estrutura química pelo menos um anel pirrole, sendo classificados como compostos azólicos (47).

Os antifúngicos azólicos podem apresentar-se em várias formas farmacêuticas: pomadas, cremes, preparações orais, pós, soluções e preparações para administração endovenosa (47,48).

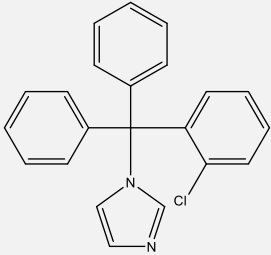
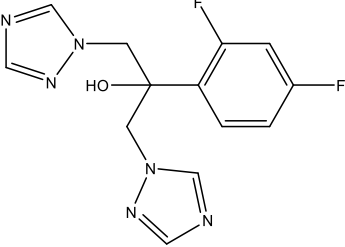
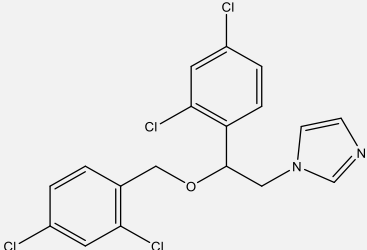
O clotrimazol, devido ao seu elevado grau de toxicidade, não é usado sistemicamente, sendo administrado topicamente. É vulgarmente usado no tratamento de vulvovaginites de origem fúngica, dermatomicoses e infeções oculares (47,48).

O fluconazol pode ser administrado por via oral ou via endovenosa, devido à sua boa hidrossolubilidade e boa biodisponibilidade oral. Este fármaco é o antifúngico de escolha no tratamento da meningite criptocócica, candidemia, candidose mucocutânea e no tratamento de infeções provocadas pelo fungo *Candida albicans* (47,48).

O miconazol é usado topicamente e por via oral. É utilizado no tratamento e na profilaxia das candidoses da cavidade bucofaríngea, e do trato gastrointestinal, sendo também utilizado no tratamento de vulvovaginites e dermatomicoses (47,48).

Na tabela 3.1, estão apresentadas as principais características físico-químicas dos fármacos em estudo.

**Tabela 3.1:** Principais características físico-químicas dos antifúngicos estudados (49,50).

Fármaco	Classificação Farmacoterapêutica	Estrutura Química	Massa Molecular	log $k_{ow}$
Clotrimazol	Antifúngico		344,8	4,1
Fluconazol	Antifúngico		306,3	0,25
Miconazol	Antifúngico		416,1	6,25

### 3.2 Legislação em Vigor

A monitorização de fármacos em águas brutas ou de consumo humano não é de carácter obrigatório, uma vez que não é referida na legislação nacional ou internacional relacionada com a qualidade da água.

No entanto, a Diretiva 2010/84/EU relativa à farmacovigilância, reconhece que a poluição das águas e dos solos por resíduos farmacêuticos constitui um problema ambiental. Desta forma, os estados-membros devem estudar medidas para fiscalizar e avaliar o risco desses fármacos sobre o ambiente e na saúde pública. A comissão deve ainda elaborar um relatório sobre a dimensão do problema e avaliar a necessidade de alterar a legislação sobre medicamentos ou outra legislação aplicável da União Europeia (51).

Em 2013, pela primeira vez no domínio da política da água, a Diretiva 2013/39/EU, apresentou disposições específicas para substâncias farmacêuticas, definindo que a comissão deveria elaborar uma abordagem estratégica em matéria de poluição da água causada pelos fármacos. Ainda nessa diretiva, a comissão estabeleceu a identificação adicional de substâncias prioritárias através do mecanismo da lista de vigilância (16).

Dentre as 19 substâncias selecionadas para a terceira lista de vigilância encontram-se dez fármacos, nomeadamente a metaflumizona, a amoxicilina e a ciprofloxacina (monitorizados desde 2018), os antibióticos sulfametoxazol e trimetoprim, o antidepressivo venlafaxina e o seu metabolito O-desmetilvenlafaxina e três produtos farmacêuticos azólicos: clotrimazol, fluconazol e miconazol. A inclusão dos vários produtos farmacêuticos está alinhada com a abordagem estratégica da união europeia relativa aos produtos farmacêuticos no meio ambiente (17).

Apesar da OMS (52,53) afirmar que vários estudos recentes apontam para uma muito pouca probabilidade dos produtos farmacêuticos na água de consumo constituírem uma ameaça para a saúde humana às baixas concentrações em que são detetados, a questão dos resíduos farmacêuticos não pode ser ignorada e necessita de uma abordagem cautelar, bem como da introdução de um parâmetro relevante na Diretiva da Água Potável (38).

## Capítulo 4 – Metodologias Analíticas

### 4.1 Notas Introdutórias

As metodologias utilizadas para a determinação de compostos em concentrações vestigiais são de grande interesse, pois permite a monitorização de compostos existentes na água e consequente avaliação da qualidade da mesma. Neste estudo para a preparação da amostra foi realizada a técnica de extração em fase sólida, e para a análise subsequente dos compostos de interesse utilizou-se a cromatografia.

A preparação das amostras é uma etapa fundamental que precede a determinação do analito e pode ser determinante para o sucesso ou fracasso do método de análise. A extração em fase sólida (*SPE*, do inglês, *Solid Phase Extraction*) tornou-se um dos principais métodos de extração de solutos nas últimas décadas. Dentre seus principais atrativos podem ser destacados o alto fator de concentração dos solutos, a possibilidade de realização de inúmeras extrações simultâneas e a redução do uso de solventes orgânicos, além de ser uma técnica que pode ser automatizada. O uso dessa técnica para a preparação das amostras de água contribui ainda na redução das perdas dos contaminantes por degradação e adsorção (54).

Na identificação e quantificação de componentes químicos presentes em uma mistura complexa, são comumente utilizados métodos cromatográficos associados a um espectrómetro de massa. Enquanto a cromatografia é um poderoso método de separação encontrando aplicações em todos os ramos da ciência, a espectrometria de massa (*MS*, do inglês, *Mass Spectrometry*) é uma ferramenta analítica indispensável que visa identificar um composto a partir da massa molecular ou atômica de seus constituintes. Essas duas técnicas quando combinadas apresentam grande versatilidade e sensibilidade (55).

### 4.2 Preparação da Amostra – Extração em Fase Sólida

#### 4.2.1 Notas Introdutórias

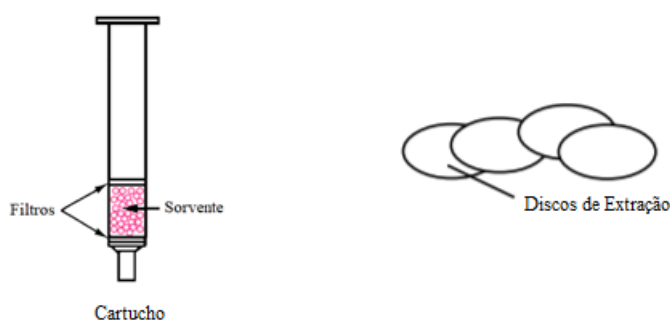
A SPE é uma técnica de separação sólido-líquido projetada para extrair, particionar e/ou adsorver um ou mais componentes de uma fase líquida (amostra) para a fase estacionária (sorvente ou resina) (56). Além de apresentar facilidade de automação, altas percentagens de recuperação do

analito e menor consumo de solvente orgânico, quando comparada a clássica extração líquido-líquido, a SPE aumenta a vida útil de um sistema cromatográfico e melhora as análises qualitativas e quantitativas ao remover interferentes presentes na amostra (56,57).

A extração em fase sólida, atualmente, é uma das técnicas mais utilizadas para extração e concentração de amostras complexas, permitindo que analitos em concentrações muito baixas sejam detetados por métodos cromatográficos (57). O primeiro relato experimental das aplicações do SPE é datado de 1949, onde um cilindro de ferro preenchido com carvão ativado foi utilizado na concentração de compostos orgânicos presentes em águas superficiais através da filtração (58).

Na forma mais comum, a técnica emprega fases sólidas também denominadas de sorventes e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos na cromatografia líquida em coluna, nomeadamente, fase normal, reversa e de troca iônica.

A SPE utiliza cartuchos empacotados em formato de seringa contendo cerca de 50 a 500 mg de sorvente, com 40 a 60  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula, fixado na seringa por meio de dois filtros de tamanho de poros de 20  $\mu\text{m}$ . Outro tipo de dispositivo utilizado é o disco de extração, nos quais as partículas ativas são imobilizadas em uma matriz inerte e estável de microfibras de politetrafluoretileno (PTFE) ou vidro. Um disco típico tem 47 mm de diâmetro interno e 0,5 mm de espessura, contendo 500 mg de sorvente. Os diâmetros disponíveis variam de 4 a 90 mm e são definidos segundo o volume da amostra (57). A figura 4.1, apresenta os dispositivos previamente descritos.



**Figura 4.1:** Dispositivos usualmente aplicados na extração em fase sólida (adaptado de (54)).

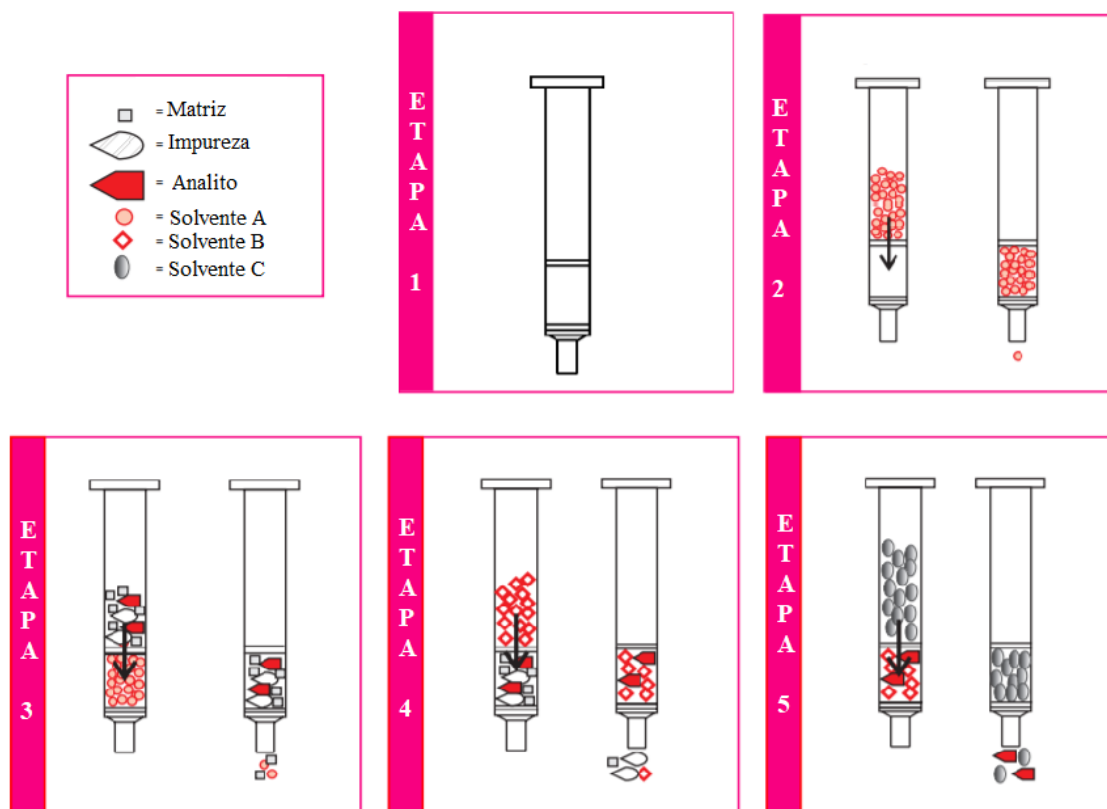
A depender se se encontra acoplada ou não a algum equipamento que permita análise direta do material retido ou se o mesmo deverá ser extraído do cartucho, a técnica pode ser classificada em *online* ou *offline*. O processo *online* ocorre quando a preparação da amostra está conectada diretamente ao cromatógrafo gasoso ou líquido, enquanto que no processo *offline* a preparação da amostra é realizada separadamente da análise cromatográfica.

### 4.2.2 Processo de Funcionamento da SPE

A extração em fase sólida (SPE) pode ser utilizada para a limpeza da amostra (remoção dos interferentes), mas também para a concentração dos analitos de interesse (compostos alvo). Regra geral a técnica é utilizada para concentrar as amostras e consequentemente os procedimentos de extração em fase sólida englobam cinco etapas: 1) escolha do dispositivo e sorvente; 2) condicionamento do sorvente; 3) introdução da amostra; 4) limpeza e secagem; e 5) eluição do analito; tal como apresentado na figura 4.2.

Para melhor entendimento das etapas realizadas no processo de funcionamento da extração em fase sólida, é importante compreender que o fenómeno resultante da atração existente entre o enchimento e o analito é definido como **retenção**. Já o processo pelo qual um analito é removido do enchimento onde ficou retido é conhecido como **eluição** (59).

A quantidade de analito e outros componentes ou interferentes da amostra transportados por um dado solvente que é retido pelo enchimento é avaliado pela **capacidade de carga**. Por fim, a possibilidade que o enchimento possui em reter prioritariamente o analito de interesse em relação a outros componentes presentes na matriz é explicado pela **seletividade** (59).



**Figura 4.2:** Etapas gerais da preparação da amostra pela técnica SPE (adaptado de (54)).

### 1) Escolha do dispositivo e sorvente

A escolha do tipo de dispositivo a ser utilizado irá depender do volume e da quantidade de partículas da amostra. O tipo de enchimento deve ser selecionado de acordo com os mecanismos de retenção pretendidos. A maioria dos sorventes disponíveis comercialmente baseia-se em grupos orgânicos, como C18, C8, C2, ciclohexil, fenil, cianopropil, aminopropil (NH<sub>2</sub>), ligados quimicamente à sílica. Outros sorventes incluem o carvão ativado ou as fases poliméricas, como o copolímero poliestireno divinilbenzeno, entre outros (54,57).

### 2) Condicionamento do sorvente

Uma exigência para a efetiva adsorção dos compostos de interesse pela fase sólida é o perfeito contato entre o soluto e o sorvente. Dessa forma, é necessário uma preparação prévia do sorvente com um solvente adequado, afim de promover um contato eficaz com a amostra, optando-se por um solvente com características similares ao solvente no qual a amostra encontra-se dissolvida, baseando-se no princípio de que “semelhante dissolve semelhante” (57).

### 3) Introdução da amostra

A amostra é forçada a passar pelo material extrator pela aplicação de pressão em uma das extremidades do dispositivo, onde ficaram retidos os analitos de interesse. Para que se obtenha a eficiência máxima de extração, é necessário determinar o volume máximo da amostra que deve ser processado para que se obtenha a maior recuperação possível do analito (57,60).

### 4) Limpeza e secagem

Nessa etapa é realizada a limpeza do cartucho para retirar interferentes menos retidos que o analito. Esta etapa é conhecida como *clean up* ou lavagem com solvente. Deve-se utilizar um solvente ou mistura de solvente que tenha força suficiente para arrastar os interferentes, porém não os analitos. Geralmente, a solução para eluição dos interferentes contém menos solvente orgânico, menor concentração salina ou encontra-se num pH ideal para a eluição apenas dos interferentes (57).

Após a lavagem do cartucho, o mesmo encontra-se com água retida nos seus poros. Se após a eluição, o solvente orgânico e a água forem imiscíveis o eluato apresentará duas fases; caso sejam miscíveis, a diluição dos analitos será maior do que a desejada. Deste modo, deve-se remover o máximo de água possível previamente à eluição através da aplicação de um baixo vácuo durante alguns minutos ou por passagem de ar ou azoto através na coluna (61).

### 5) Eluição do analito

Para eluir o analito de interesse o solvente, ou mistura de solventes, deve possuir maior força que o solvente utilizado na etapa de limpeza. Esta extração ocorre devido à maior afinidade dos analitos com o solvente de eluição do que para o tipo de enchimento. Após a eluição do analito, procede-se à concentração do mesmo para eliminação do solvente (57).

#### 4.2.3 Fatores que Influenciam na Seletividade e Eficiência da SPE

É instrutivo tomar conhecimento de alguns fatores que são capazes de influenciar a seletividade e a eficiência do método de preparação da amostra, podendo vir a resultar em métodos não robustos, longos tempos de desenvolvimento e custos excessivos. Parâmetros experimentais como a interação do sorvente com o analito, o volume da amostra e o efeito do pH devem ser considerados ao realizar uma extração em fase sólida (62,63).

A eluição dos analitos depende, essencialmente, das interações existentes entre a amostra e as partículas do sorvente, porém o comportamento do analito pode variar de acordo com a diferença das estruturas presentes no material que compõe a fase sólida (tamanho e grau de hidrofobicidade) (62).

O volume da amostra nunca deve exceder o volume a partir do qual se atinge a capacidade máxima do enchimento, posto que, a partir do momento em que o cartucho se encontra saturado o mesmo não consegue mais reter os compostos de interesse passando a os eluir, resultando num decréscimo na recuperação. O volume em que a capacidade máxima do enchimento é atingida é chamado de *breakthrough* (63).

Na análise de compostos ionizáveis, o efeito do pH é mais presente, sendo assim necessária a determinação da faixa de pH em que o composto apresenta maior retenção na fase sólida e, portanto, menor dissociação no solvente. O ajuste do pH é necessário para assegurar que os compostos estão na forma apropriada para alcançar uma eficiente retenção na fase sólida (63).

## 4.3 Cromatografia

### 4.3.1 Nota Introdutória

As técnicas de separação cromatográficas são conhecidas há séculos, e o primeiro cientista a utilizar o termo foi o botânico russo Mikhail Semenovitch Tswett, em 1901, para realizar a separação de vários pigmentos vegetais, como clorofilas e xantofilas, utilizando soluções desses compostos



através de uma coluna de vidro empacotada com carbonato de cálcio. Os compostos separados apareceram como faixas coloridas na coluna, o que explica o nome escolhido para o método, do grego antigo cor ( $\chiρωμα$ , *chroma*) e escrita ( $γραφειν$ , *graphein*).

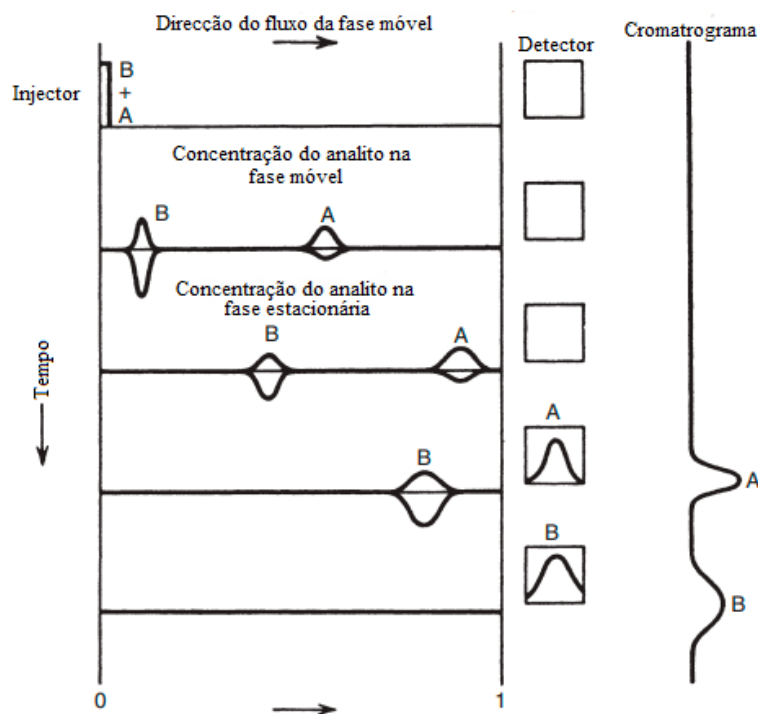
Geralmente, a cromatografia nada mais é que a separação de componentes de uma matriz complexa através da interação dinâmica entre uma fase móvel e uma fase estacionária imiscíveis. As aplicações da cromatografia têm crescido de maneira exponencial, devido não apenas ao desenvolvimento de vários novos tipos de técnicas cromatográficas, mas também pela necessidade crescente de melhores métodos de caracterização de misturas complexas (55,64).

#### 4.3.2 Princípios Teóricos

A cromatografia tem por objetivo a separação de substâncias presentes em uma mistura para fins analíticos ou preparativos. Em todas as separações cromatográficas a amostra é dissolvida em uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Esta fase móvel é então forçada através de uma fase estacionária imiscível, que é suportada em uma coluna ou superfície sólida. As duas fases são escolhidas para que os componentes da amostra se distribuam entre a fase móvel e estacionária em vários graus. Os componentes fortemente retidos pela fase estacionária movem-se de maneira mais lenta na coluna. Em contraste, os componentes que são fracamente retidos pela fase estacionária viajam pela coluna mais rapidamente. Como consequência, essas diferenças são refletidas em bandas ou zonas discretas indicando a separação dos componentes da mistura que podem ser analisadas qualitativa e quantitativamente (55). Na figura 4.3, encontra-se uma representação esquemática do processo cromatográfico descrito.

As linhas horizontais representam a coluna cromatográfica, sendo cada linha um instante do processo num momento diferente. No primeiro instante, a amostra, composta por A e B, é introduzida na coluna. Nos instantes seguintes é observado, através dos picos, a partição dos componentes entre a fase móvel (acima da linha) e a fase estacionária (abaixo da linha). O componente A possui uma maior distribuição na fase móvel, sendo este transportado através da coluna com velocidade mais elevada que o componente B, que apresenta maior interação com a fase estacionária (65).

De maneira a facilitar a compreensão da técnica cromatográfica, uma série de conceitos teóricos serão pormenorizados.



**Figura 4.3:** Esquema representativo do processo cromatográfico (adaptado de (65)).

### Eluição e Eluato

O processo de saída da coluna cromatográfica é denominado eluição, a mistura de fluídos da fase móvel (gasosa ou líquida) e os componentes separados nele contido é denominado de eluato (55).

### Coefficiente de Partição e Fator de Retenção

A velocidade com que as moléculas de um composto viajam na fase móvel ao longo da coluna cromatográfica é governado pelo equilíbrio dinâmico de adsorção e dessorção do componente da fase estacionária. Para um composto  $Ci$ , é definido um coeficiente de distribuição ou coeficiente de partição  $K_i$ , através da razão de concentrações na fase estacionária  $[Ci]_e$ , pelas concentrações na fase móvel  $[Ci]_m$ , como mostra a equação (4-1):

$$K_i = \frac{[Ci]_e}{[Ci]_m} \quad (4-1)$$

Alguns compostos irão residir por mais tempo na coluna devido a maior adsorção à fase estacionária e serão os últimos compostos a serem eluídos. Os compostos que eluem primeiro da coluna experimentam uma menor interação com a fase estacionária, de modo que, não serão retidos durante o percurso e encontrarão a saída da coluna de maneira mais rápida (27). A velocidade de

migração de um componente pode então ser indicada pelo fator de retenção  $k_i$ , que é definido como a razão do número de moléculas que residem na fase estacionária  $n_e$ , e as moléculas que se encontram na fase móvel  $n_m$ , de acordo com a equação (4-2):

$$k_i = \frac{n_e}{n_m} \quad (4-2)$$

### **Tempo de Retenção**

Embora o coeficiente de partição seja fundamental para separações cromatográficas, o mesmo não é facilmente medido. Logo, utilizamos o tempo de retenção  $t_r$  para quantificar o tempo que um componente necessita para eluir da coluna.

Mesmo assumindo que não haja interação entre a fase móvel e a fase estacionária (fator de retenção próximo a zero), existe um tempo mínimo necessário para que a fase móvel percorra toda a coluna cromatográfica, o qual é definido como tempo morto  $t_m$ . Nenhum composto deve deixar a coluna antes do  $t_m$ . Deve-se considerar ainda as interações das moléculas com a fase estacionária durante o percurso cromatográfico, levando a um tempo adicional designado por tempo de retenção ajustado  $t'_r$ . O tempo de retenção pode ser calculado pela equação (4-3):

$$t_r = t_m + t'_r \quad (4-3)$$

O tempo de retenção é característico de um composto para uma dada configuração cromatográfica, sendo constante, desde que as condições cromatográficas permaneçam inalteradas. O uso de uma coluna mais longa acarretará em um aumento no tempo de retenção, e o aumento do fluxo da fase móvel reduzirá o mesmo (55,64).

### **Seletividade**

A seletividade,  $\alpha$ , de um sistema cromatográfico é uma medida do afastamento relativo entre dois picos adjacentes no cromatograma, podendo ser expressa pela equação (4-4):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (4-4)$$

onde  $k_1$  e  $k_2$  são os coeficientes de partição do primeiro e segundo pico, respetivamente. De acordo com esta definição, a seletividade tem sempre um valor superior à unidade.

### **Eficiência da Coluna**

Em 1941, Martin e Synge sugeriram que o conceito de “altura equivalente de um prato teórico” ( $H$ ), bem difundida para uso em destilação fracionária, poderia ser aplicado também para as cromatografias em coluna (66).

A eficiência da separação pode ser explicada por uma analogia com processos de destilação e extração em contra corrente e pode ser medida por um parâmetro: pratos teóricos. Na destilação os pratos realmente existem, são por eles que o vapor passa através de uma fase líquida e, assim, a distância de um prato a outro (altura) pode ser medida. Durante esse processo é assumido que o sistema esteja em equilíbrio. Na coluna cromatográfica os pratos não podem ser observados fisicamente e por isso são denominados pratos teóricos. Entretanto, é possível calcular a altura equivalente a um prato teórico ( $H$ ) a partir do comprimento da coluna. Dessa forma, o conceito utilizado em destilação é estendido para explicar o processo cromatográfico (67).

Podemos relacionar dois termos amplamente utilizados para quantificar a medida de eficiência de uma coluna: a altura equivalente a um prato teórico ( $H$ ) e o número de pratos teóricos ( $N$ ). Diferenças na eficiência podem ser justificadas pelo uso de diferentes tipos de coluna, fase móvel e fase estacionária. Em termos de números de pratos teóricos, as eficiências podem variar de algumas centenas a várias centenas de milhares, variando apenas de alguns décimos a um milésimo de centímetro ou menos quando se trata da altura equivalente a um prato teórico (65).

O segredo para obtenção de separações de alta resolução é o uso de colunas cromatográficas de maiores comprimentos ( $L$ ), implicando em uma maior quantidade de número de pratos teóricos e a diminuição da altura entre os mesmos, como mostra a equação (4-5):

$$N = \frac{L}{H} \quad (4-5)$$

Por outro lado, a altura dos pratos teóricos pode ser determinada pela equação (4-6):

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (4-6)$$

em que  $\sigma^2$  representa o desvio padrão ao quadrado (55,68).

O número de pratos teóricos,  $N$ , pode também ser definido pela equação (4-7) para picos simétricos, na qual  $\omega$  representa a largura de base do pico. Ocasionalmente, as larguras da linha de base podem ser problemáticas para medir de forma confiável devido a ruídos, desvios, assimetrias de pico ou presença de picos parcialmente resolvidos. Um procedimento comum adotado para evitar esse tipo de dificuldade é realizar a medição da largura do pico a meia altura ( $\omega_{1/2}$ ). Sendo assim, a equação (4-8) pode também ser utilizada (69).

$$N = 16 \times \left( \frac{t_r}{\omega} \right)^2 \quad (4-7)$$

$$N = 5,54 \times \left( \frac{t_r}{\omega_{1/2}} \right)^2 \quad (4-8)$$

Ao longo da coluna cromatográfica, a zona ocupada por um componente tende a expandir, causando assim um alargamento de banda dos picos e consequente diminuição da eficiência. Esse fenómeno possui a contribuição de três parâmetros:

- Efeito de caminho múltiplo,  $A$ , causada pelos diferentes caminhos que as moléculas podem viajar através de um material poroso;
- Difusão longitudinal,  $B$ , do componente para frente e para trás na fase móvel;
- Resistência à transferência de massa,  $C$ ; um termo coletivo para qualquer efeito relacionado a adsorção, dessorção e convecção durante a migração.

A altura equivalente de um prato teórico ( $H$ ), pode ser expressa em termos dos parâmetros acima e da velocidade da fase móvel,  $u$ , pela equação de van Deemter (4-9):

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (4-9)$$

Uma eficiência elevada é atingida com um número elevado de pratos teóricos, correspondentes a uma menor largura das bandas e, consequentemente permitindo uma melhor separação entre diversos picos. Por outro lado, a eficiência da coluna está inversamente relacionada com a altura dos pratos teóricos (55).

### **Resolução Cromatográfica**

Outro parâmetro crítico é a resolução,  $R_s$ , que quantifica a capacidade de separação entre picos adjacentes, e pode ser expressa em função do número de pratos teóricos como mostra a equação (4-10):

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \times \left( \frac{k}{k-1} \right) \times \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \quad (4-10)$$

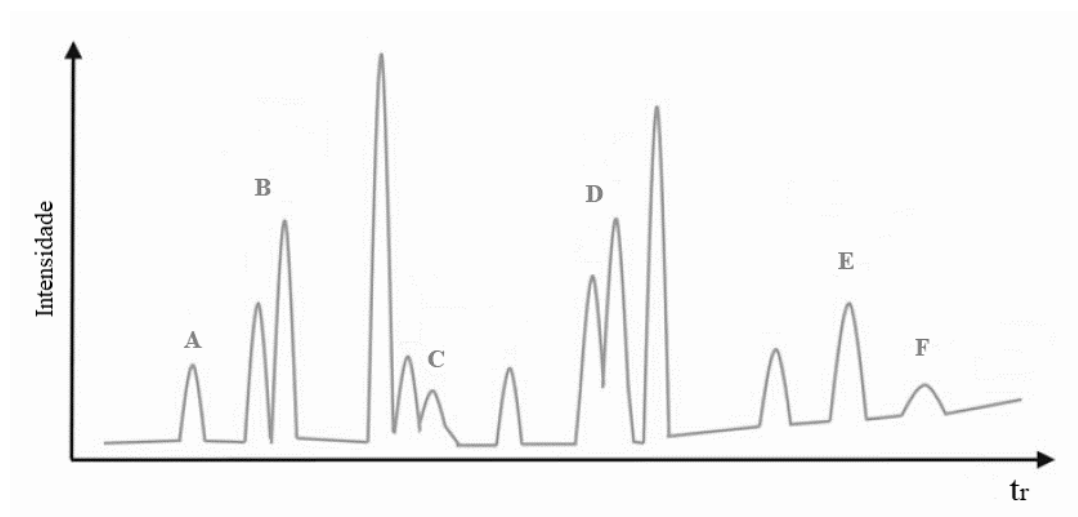
onde  $\alpha$  representa o fator seletividade e  $k$  representa o fator de retenção. A análise da equação nos permite observar que a eficiência, usualmente medida pelo número de pratos teóricos,  $N$ , é apenas um dos fatores que determinam a resolução cromatográfica.

Enquanto  $N$  depende principalmente do comprimento e do diâmetro interno (d.i.) da coluna,  $\alpha$  e  $k$  dependem da estrutura química da fase estacionária e da espessura do filme (df) que reveste as paredes da coluna.

A separação entre os picos é considerada ótima quando  $R_s \geq 1,5$ . Resoluções que apresentam valores abaixo de 1,5 correspondem a uma separação de maior ou menor grau de sobreposição entre os picos (69).

### **Cromatograma**

O resultado de uma separação cromatográfica é apresentado como um cromatograma, exibindo as intensidades relativas dos picos *versus* o tempo de retenção. Idealmente, todos os componentes são separados uns dos outros e a linha de base dos picos é plana. No mundo real da cromatografia é necessário lidar com algumas deformações nos picos, como mostra a figura 4.4 (55).



**Figura 4.4:** Diferentes formas de picos cromatográficos. Pico gaussiano ideal (A), picos separados (B), *tailing* (C), sobreposição (D), alargamento (E), e derivada da linha de base (F) (adaptado de (55)).

Cada tipo de distorção pode apresentar diversas causas, porém, o mais importante é efetuar uma análise detalhada do problema para encontrar, de maneira mais rápida, uma resolução.

## 4.4 Cromatografia Gasosa

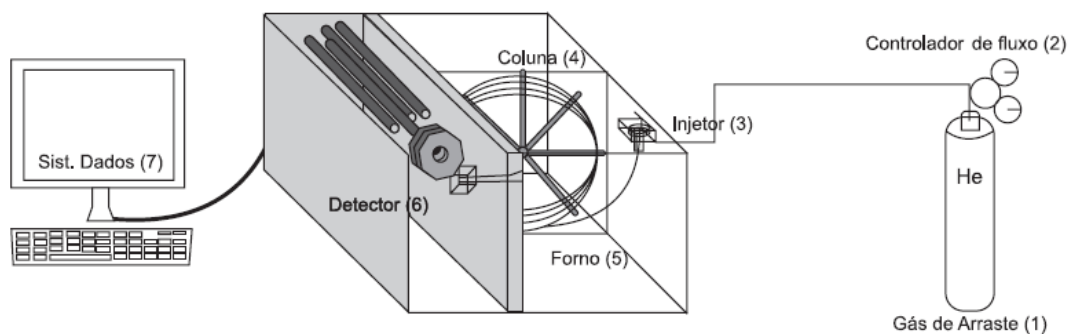
### 4.4.1 Nota Introdutória

O conceito da cromatografia gasosa (GC) foi introduzido pela primeira vez por Martin e Synge em 1941, mas foi somente em 1952 que Martin, juntamente com James, relatou a separação de ácidos gordos voláteis, através da cromatografia de partição, utilizando azoto como fase móvel. Descobriu-se rapidamente que a GC era simples, rápida e aplicável à separação de muitos materiais voláteis, especialmente petroquímicos, para os quais a destilação era o método preferido de separação naquele tempo (65,70).

O desenvolvimento da cromatografia em todas as suas formas é, até os dias atuais, minuciosamente explorado, o que permite o desenvolvimento de equipamentos cada vez mais sensíveis, automatizados e robustos (65).

### 4.4.2 Cromatógrafo Gasoso

Apesar dos componentes do sistema de instrumentação terem evoluído nos últimos anos, faz-se notar em todos os equipamentos as semelhanças dos princípios base. Um sistema GC possui como componentes principais: gás de arraste, injetor, coluna, forno, detetor e um sistema de recolha e tratamento de dados (55,69). Na figura 4.5, encontra-se uma representação esquemática dos componentes básicos de um sistema de cromatografia gasosa.



**Figura 4.5:** Componentes da instrumentação de um cromatógrafo gasoso (71).

Neste sistema, a amostra é introduzida num injetor aquecido, que efetua a vaporização repentina e mistura o vapor da amostra ao fluxo do gás de arraste. Após o injetor a amostra é

transportada pelo gás através de um tubo de separação chamado de “coluna”, onde ocorre a separação dos diversos componentes presentes na amostra. Por fim, os compostos seguem para o detetor, sendo os dados registados num computador (55).

#### 4.4.2.1 Gás de Arraste

O gás de arraste possui como objetivo principal transportar a amostra através da fase estacionária sem alterar sua estrutura e conduzi-la ao detetor com o mínimo de interferência possível. Os principais gases de arraste utilizados são hélio (He), azoto (N<sub>2</sub>) e hidrogénio (H<sub>2</sub>) (71).

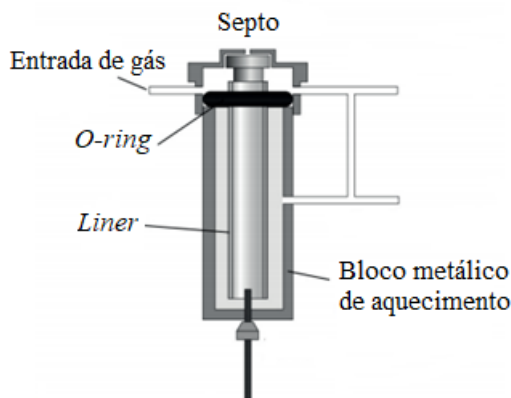
É de grande importância que o gás de arraste possua um elevado índice de , uma vez que, imis que o mesmo possa carregar, tais como água e oxigénio, podem atacar quimicamente a fase líquida na coluna e destruí-la (65).

Outra consideração importante para o tipo de gás, mesmo não diretamente relacionado à eficiência da coluna, é se um espectrómetro de massa é usado como detetor de saída de vácuo para o GC. Em quase todos os casos, o hélio é o gás de escolha, não só pela sua eficiência cromatográfica, mas também por ser mais fácil de bombear do que o hidrogénio. O hidrogénio pode ser reativo em fontes de MS, levando a uma mudança indesejável no espectro para alguns compostos. O azoto normalmente não é uma opção de gás para GC/MS, devido à redução da sensibilidade (72).

#### 4.4.2.2 Injetor

A análise cromatográfica começa efetivamente com a injeção da amostra no injetor (vaporizador), o qual, em sua forma básica, é composto de um bloco metálico que é conectado à coluna. Na maioria das aplicações atuais, usa-se um pequeno tubo de quartzo ou vidro (*liner*) com o objetivo de promover um aquecimento mais homogêneo. Na parte superior, existe um anel de vedação e um septo por onde a amostra é injetada com o auxílio de uma seringa; na parte inferior, o *liner* se conecta à coluna. Na figura 4.6, encontra-se uma representação esquemática de um sistema de injeção (71).





**Figura 4.6:** Sistema de injeção (adaptado de (71)).

Os septos são usados como componentes de vedação e entrada para as amostras em cromatografia gasosa. O anel de vedação entre o meio externo e o injetor é chamado de *o-ring*. O bloco metálico é um componente que envolve o sistema de injeção, e conectado ao mesmo há uma resistência elétrica com um termostato que permite ajustar a temperatura do injetor (71).

A câmara de vaporização, comumente chamada de *liner*, tem uma importante função na vaporização das amostras, pois, elimina o contato da amostra com o metal promovendo um aquecimento mais uniforme da mesma. Um bom *liner* deve fornecer condições ideais para a vaporização da amostra e ser inerte o suficiente para não interagir com a amostra a ser analisada. Além disso, deve possuir um volume suficiente para conter a amostra após a expansão (71).

O modo de injeção pode ser realizado com ou sem a divisão do fluxo (*split/splitless*). Na injeção em modo *split*, normalmente, a amostra encontra-se no estado líquido, sendo introduzida em um espaço aquecido, *liner*, que rapidamente vaporiza a amostra, misturando-a com o gás de arraste e gerando um fluxo turbulento. O fluxo da mistura gasosa é rapidamente conduzido para a coluna, e apenas uma fração dessa mistura entra na coluna, sendo o restante descartado (71).

A injeção no modo *splitless* é realizada em um *liner* aquecido. Diferente do modo *split*, neste caso, a válvula de divisão de fluxo está fechada, e tudo que é injetado vai para a coluna.

Outra possibilidade de injeção da amostra consiste na técnica *cool on-column*, onde a amostra é injetada diretamente na coluna, e em seguida, um sistema de resfriamento é colocado em torno do injetor para que as amostras possam ser injetadas a baixas temperaturas. Esta técnica é vantajosa para amostras de alta massa molecular, uma vez que a amostra ao ser depositada diretamente na coluna aumenta a reprodutibilidade, devido a baixa ou inexistente discriminação e decomposição da amostra. A injeção *on-column* é pouco utilizada para a análise de matrizes complexas, pois as substâncias de maior ponto de ebulição tendem a se acumular na coluna (71).

#### 4.4.2.3 Coluna Cromatográfica

A fase estacionária é a principal responsável pela separação dos analitos em uma análise por GC, ficando contida no interior da coluna cromatográfica. Dois tipos gerais de colunas são usados na cromatografia gasosa: as colunas empacotadas e as capilares.

No passado a grande maioria das análises utilizavam colunas empacotadas. Este nome deve-se ao facto de a coluna ser preenchida com partículas uniformes e finamente divididas, geralmente de sílica. As colunas empacotadas são, geralmente, confeccionadas com aço inoxidável ou vidro, e a sílica usada no preenchimento pode ser a própria fase estacionária ou pode servir de suporte para uma fase estacionária líquida não volátil (55,71).

Atualmente, as colunas empacotadas têm sido substituídas pelas colunas capilares que proporcionam melhor resolução, maior sensibilidade e menor tempo de análise quando em comparação com as empacotadas. Podem ser fabricadas com vidro, aço inoxidável ou sílica fundida ( $\text{SiO}_2$ ) e possuem revestimento de um material protetor, geralmente poliimida, um polímero capaz de resistir até 350 °C.

A temperatura da coluna é uma variável importante que deve ser controlada até ao décimo de grau Celsius para um trabalho preciso. A temperatura ideal da coluna depende do ponto de ebulição da amostra e do grau de separação necessário. Para amostras com uma ampla faixa de ebulição, muitas vezes é desejável empregar programação de temperatura, em que a temperatura da coluna é aumentada continuamente ou em etapas à medida que a separação prossegue (64).

Para uma coluna cromatográfica operar em condições satisfatórias, ela deve estar condicionada, bem instalada no forno do cromatógrafo e operar em limites de temperaturas recomendadas ao tipo de fase estacionária.

Em termos de dimensões, as colunas cromatográficas empacotadas podem variar desde 1,2 m a 1,5 m de comprimento e de 2 mm a 9 mm de diâmetro. As colunas capilares são de 30 m a 300 m de comprimento com diâmetros de 0,25 mm a 0,5 mm. Como a coluna situa-se dentro do forno, é necessário que as mesmas sejam enroladas para que caibam no compartimento (73).

#### 4.4.2.4 Forno

A retenção de um analito é essencialmente dependente da sua natureza química e da fase estacionária. O parâmetro que expressa a tendência do analito em se distribuir entre a fase móvel e a estacionária, como já descrito anteriormente, é a constante de distribuição ou coeficiente de partição ( $K_i$ ). Esse, por ser um parâmetro termodinâmico, é influenciado pela temperatura. Assim, os valores

de  $K_i$  dos analitos podem ser alterados, com o controlo da temperatura, para modificar a retenção e melhorar a separação cromatográfica. Sendo assim, um bom controlo de temperatura é essencial para a separação.

O forno deve ser robusto e ao mesmo tempo sensível para manter a temperatura programada e permitir um rápido aquecimento e resfriamento. O modo como a temperatura do forno varia de maneira controlada durante a análise cromatográfica é chamado de programação de temperatura. O controlo de temperatura é ajustado no software do cromatógrafo. Quando a temperatura do forno permanece constante durante a corrida, diz-se que o método é isotérmico; quando sofre variação, chama-se de método com temperatura programada (71).

#### **4.4.2.5 Detetor**

O processo cromatográfico não inclui os meios para identificar um composto, com exceção de substâncias coloridas onde podemos ter a chance de detetar a eluição simplesmente pela coloração repentina do eluato, sendo necessário usar algum tipo de detetor capaz de verificar quando um composto elui (55).

Em um sistema cromatográfico gasoso, os detetores têm a função de converter o analito eluído da coluna em sinal eletrónico, o qual é enviado para o sistema de dados. A grandeza do sinal é representada em função do tempo (desde o momento da injeção) e apresentada na forma de um cromatograma (71).

Vários detetores foram investigados e usados para a separação cromatográfica. Em alguns casos, cromatógrafos a gás são acoplados a espectrómetros de massa. Com tais sistemas, a identificação dos analitos torna-se possível. Alguns detetores são capazes de responder a moléculas de diferentes grupos químicos, a estes nomeamos de universais (detetor de ionização de chama), enquanto outros respondem apenas a analitos de grupos funcionais ou a estruturas específicas e são denominados seletivos (detetor de captura eletrónica, detetor de azoto e fósforo, entre outro). Os detetores seletivos apresentam maior intensidade do sinal analítico, ou seja, possuem uma maior sensibilidade (55,71).

### **4.5 Cromatografia Gasosa associada à Espectrometria de Massa**

A análise de misturas complexas geralmente requer a combinação de duas técnicas, uma para a separação e outra para a deteção dos compostos. O acoplamento da cromatografia gasosa com a espectrometria de massa (GC/MS), teve como objetivo obter uma ferramenta analítica mais eficiente

e rápida que as técnicas convencionais, apresentando grande versatilidade e tornando-se um método de rotina para a análise de misturas. A este acoplamento realizado entre estas técnicas foi dado o nome de “técnicas hifenadas”.

A expansão desta abordagem possibilitou o acoplamento de métodos eficientes de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia gasosa, com técnicas espectrométricas como o espectrofotômetro de UV-Vis, espectrômetro de massas (MS e MS/MS) e ressonância magnética nuclear (RMN), que fornecem informações adicionais sobre a estrutura química dos componentes da amostra, funcionando como detetores (55,71).

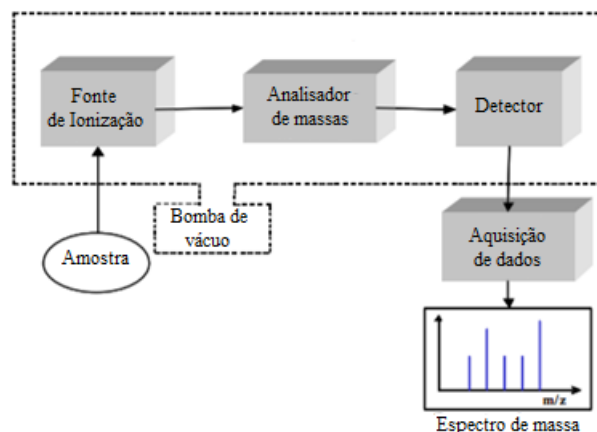
#### 4.5.1 Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa é uma ferramenta analítica indispensável em muitos campos relacionados a ciência que visam identificar um composto a partir da massa molecular ou atômica de seus constituintes. O princípio básico é gerar íons de quaisquer compostos inorgânicos ou orgânicos por qualquer método adequado, e separar esses íons pela sua razão massa-carga ( $m/z$ ), detetando-os assim de maneira qualitativa e quantitativa.

O primeiro instrumento a separar íons pela relação massa-carga foi construído por Joseph John Thomson na sua tentativa de compreender as descargas elétricas em gases e analisar as espécies carregadas em fase gasosa. O seu trabalho levou à descoberta de átomos, isótopos e, portanto, ao seu reconhecimento como o pai da espectrometria de massa (55).

O espectrômetro de massas é constituído por um compartimento fechado a vácuo para que não haja interferência com a atmosfera. Dentro do compartimento existem três secções que caracterizam o equipamento: a fonte de ionização, em que a amostra gasosa a ser analisada é convertida em íons; o analisador de massas, onde os íons são separados e discriminados em função da sua  $m/z$ ; e o detetor, no qual os íons são detetados e transmitidos para um sistema de aquisição de dados resultando em um espectro de massas conforme ilustra a figura 4.7.

Se o analito a ser analisado for suficientemente volátil e termicamente estável, podem ser consideradas inúmeras maneiras de introduzir a amostra no equipamento. Quando acoplado à cromatografia gasosa, a introdução da amostra é realizada pela coluna capilar ligada diretamente à fonte de ionização. Devido ao fluxo de gás de arraste nesse tipo de coluna ser muito baixo, todo o fluxo é transferido sem que haja destruição do vácuo (74).



**Figura 4.7:** Esquema geral de um espectrômetro de massa (adaptado de (75)).

#### 4.5.1.1 Fonte de Ionização

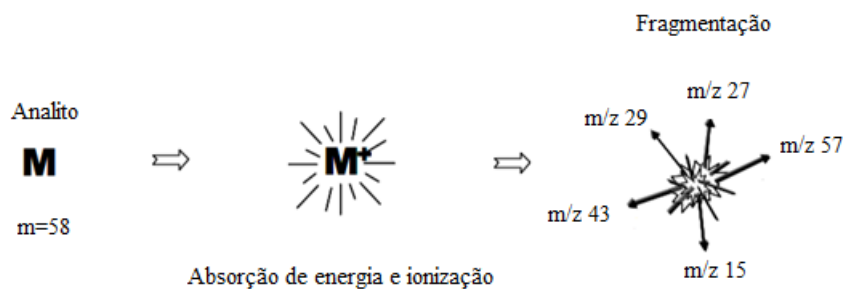
O requisito básico para uma análise por espectrometria de massa é a formação de íões livres em fase gasosa. O alcance e a utilidade do método são ditados pelo processo de ionização, no qual, átomos e moléculas neutras devem ser ionizados para que possam ser analisados. Dentro das técnicas de ionização, as mais comuns são o electroionização (EI), a ionização química (CI), a ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e a ionização por *electrospray* (ESI). A escolha da fonte de ionização irá depender das características físico-químicas dos compostos a serem analisados (71,75).

Em seguida detalhar-se-á apenas a técnica utilizada nesta metodologia (GC/MS).

##### Electroionização

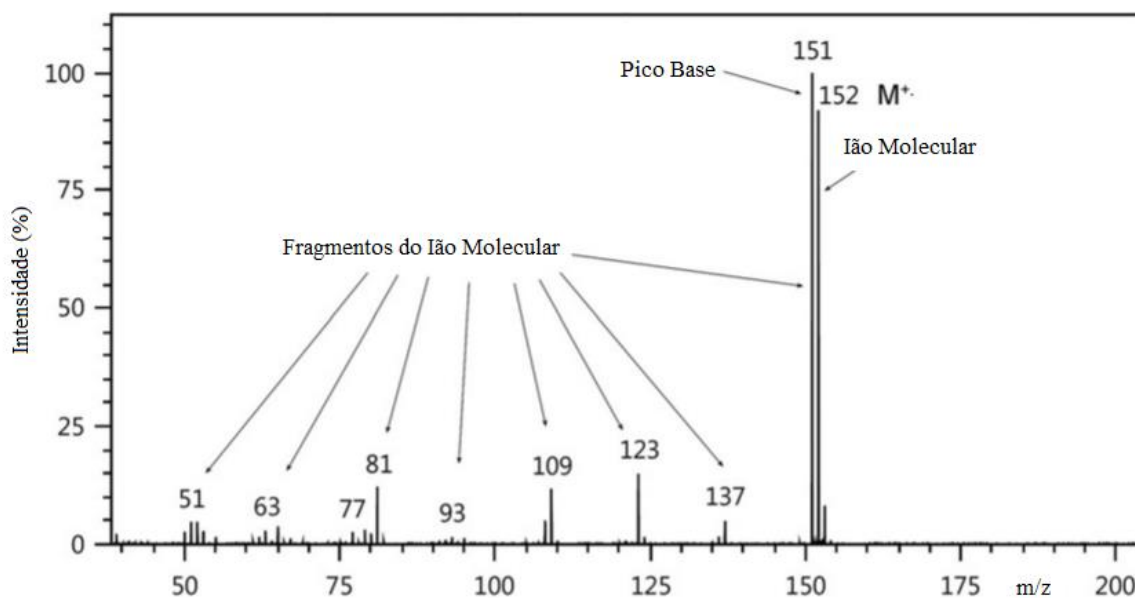
Em sua forma original a MS faz uso da técnica de electroionização, que dada a reprodutibilidade de seus resultados é utilizada para criar as bibliotecas de espectros existentes nos softwares disponíveis. O princípio é simples: um feixe de elétrons ( $e^-$ ) de alta energia, 70 eV, produzido pela passagem de uma corrente através de um filamento (geralmente de tungstênio) é direcionado para a substância de interesse “M”. O feixe de elétrons é suficientemente energético para causar a remoção de um elétron externo de M, produzindo, portanto, um íão molecular,  $M^+$  (76).

A colisão entre os elétrons e as moléculas do analito geralmente transmite energia suficiente para deixá-las em um estado excitado. Após o relaxamento, ocorre frequentemente a fragmentação de parte dos íões moleculares, produzindo íões de massas inferiores positivamente ou negativamente carregados, o que dependerá da afinidade dos prótons da amostra. O processo de ionização pela técnica de EI pode ser observado através da figura 4.8.



**Figura 4.8:** Esquema do processo de ionização por electroionização (adaptado de (75)).

Os íons positivos produzidos são atraídos pela fenda de um espectrómetro de massa onde são classificados de acordo com suas relações massa-carga e exibidos na forma de um espectro de massa (64,71).



**Figura 4.9:** Exemplo de um espectro de massa obtido através de electroionização (77).

É devido ao processo de ionização que a espectrometria de massa é considerada uma técnica destrutiva, uma vez que, o analito é totalmente consumido na análise (55).

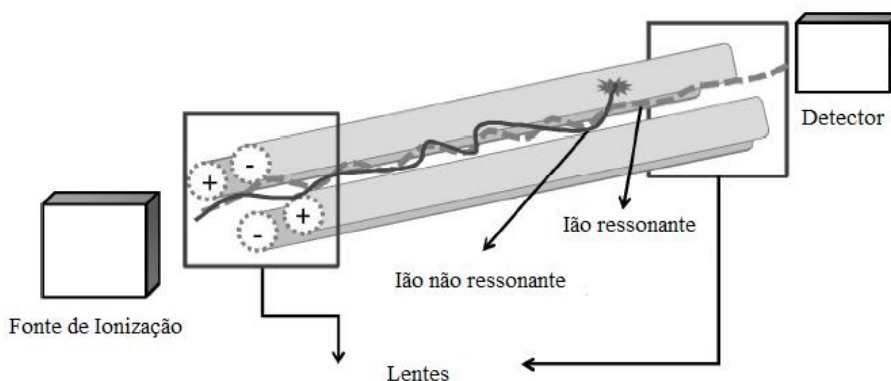
#### 4.5.1.2 Analisador de Massas

Após a ionização, o feixe de íons é acelerado por um campo elétrico e segue para o analisador de massas que irá separar os íons de acordo com as suas razões  $m/z$  através do desvio da trajetória dos fragmentos carregados quando estes são submetidos a um campo magnético. Estes analisadores

podem transmitir um simples íon de razão  $m/z$  ao detetor, ou um espectro de massa inteiro a partir de um pulso de íons.

A escolha do analisador depende da resolução, do intervalo de massa, da velocidade de varrimento e dos limites de detecção requeridos na análise. Essas configurações conferem a esses instrumentos diferentes características, sendo os analisadores mais vulgares os do tipo quadrupolo (Q), triplo quadrupolo (QqQ), armadilha de íons (IT), tempos de voo (TOF) e *orbitrap* (71).

O quadrupolo é o analisador de massa mais comumente usado quando o sistema de introdução da amostra é um cromatógrafo gasoso. Este tipo de analisador é constituído por quatro barras, usualmente de metal, equidistantes entre si e dispostas em dois pares. Um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo, enquanto que o outro a um potencial negativo, sendo aplicada a cada um dos pares uma combinação de corrente contínua e radiofrequência gerando um campo eletrostático oscilante entre as barras. A depender da razão entre a amplitude da radiofrequência e a voltagem da corrente contínua, os íons adquirem uma oscilação nesse campo eletrostático, de modo que, íons que possuam uma razão  $m/z$  pequena ou grande demais apresentem uma trajetória irregular (íons não ressonantes), colidindo com as barras e extinguindo-se. Os íons que apresentam uma razão  $m/z$  correta exibem uma oscilação estável (íons ressonantes) que lhes permitem seguir uma trajetória apropriada para atravessar o analisador até chegar ao detetor. Na figura 4.9, apresenta-se o esquema de um analisador de massas quadrupolo (71,78).



**Figura 4.10:** Representação esquemática de um analisador de massas quadrupolo (adaptado de (71)).

Apesar de usualmente ser considerado um analisador de baixa resolução, o quadrupolo apresenta características muito vantajosas, tais como a sua simplicidade, baixo custo, boa linearidade em análises quantitativas e facilidade de utilização (78).

O espectrómetro de massa pode atuar como detetor universal ou seletivo de acordo com as necessidades analíticas, sendo possível trabalhar em modo *fullscan* ou modo SIM (*Selected Ion Monitoring*). No modo *fullscan*, são efetuados varrimentos repetidamente numa gama de massas

selecionadas, enquanto que no modo SIM ocorre uma prévia seleção de dois ou mais íons característicos de cada composto e apenas esses chegam ao detetor (79).

#### 4.5.1.3 Detetor

O detetor constitui a parte final do espectrómetro de massa, e possui a função de detetar e amplificar o sinal da corrente de íons proveniente do analisador transferindo, em seguida, esses dados para o sistema de processamento. Um dos detetores mais frequentemente utilizado é o multiplicador de eletrões que funciona pela emissão de eletrões secundários, produzidos por dínodos, quando os íons provenientes dos analisadores se chocam com eles (64).

Existem dois tipos de multiplicadores de eletrões: dínodo discreto e o dínodo contínuo. Em ambos os casos, os íons colidem com a superfície interna do dínodo, e são refletidos, num processo que se repete várias vezes, e onde novos eletrões são libertados. Existem multiplicadores de eletrões com até 20 dínodos que produzem ganhos de corrente da ordem de  $10^7$  (79).

## 4.6 Cromatografia Líquida

### 4.6.1 Nota Introdutória

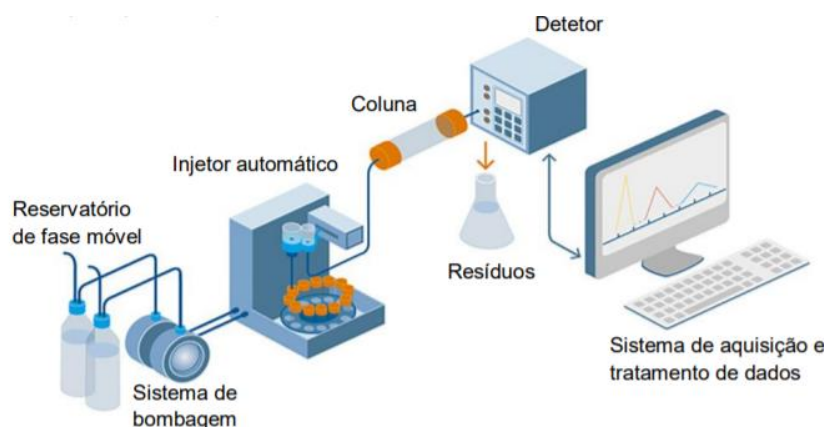
Como já referido anteriormente, a cromatografia é uma técnica de separação de componentes de uma mistura, entre uma corrente de fluído em movimento e uma fase estacionária. Para os casos em que a fase móvel usada é líquida, a operação é designada por cromatografia líquida (LC).

O desenvolvimento da LC, desde o seu início em 1950, quando se usavam colunas cheias com partículas irregulares, até os dias atuais, está voltado para o desenvolvimento contínuo de novas partículas de fase estacionária, associado à busca de melhor desempenho cromatográfico, melhor reprodutibilidade e análises mais rápidas sem a perda da eficiência e resolução. Foi em busca destes requisitos que se difundiu a HPLC.

O desenvolvimento da HPLC foi direcionado na redução do tamanho das partículas da fase estacionária e das colunas, porém apesar de atraente, a alternativa reverberou em pressões elevadas devido às modificações realizadas, não sendo compatível com os sistemas cromatográficos convencionais. Entretanto, com o uso de partículas menores que  $2\ \mu\text{m}$  foi possível o desenvolvimento da cromatografia líquida de ultra resolução (UPLC), possibilitando o uso de altas pressões no sistema e tornando as análises 20 vezes mais rápidas (80).



O princípio geral da cromatografia líquida é o mesmo para o HPLC e UPLC e assenta no facto de uma determinada substância, ao passar através de uma coluna com determinada fase estacionária é arrastada por uma fase móvel obtendo um tempo de retenção típico, dependente do fluxo, comprimento e diâmetro da coluna. A instrumentação de um LC é constituída geralmente por um sistema de bombagem, um injetor, uma coluna, um detetor e um sistema de aquisição e tratamento de dados. Na figura 4.10, está representado um sistema de cromatografia líquida e os seus principais componentes.



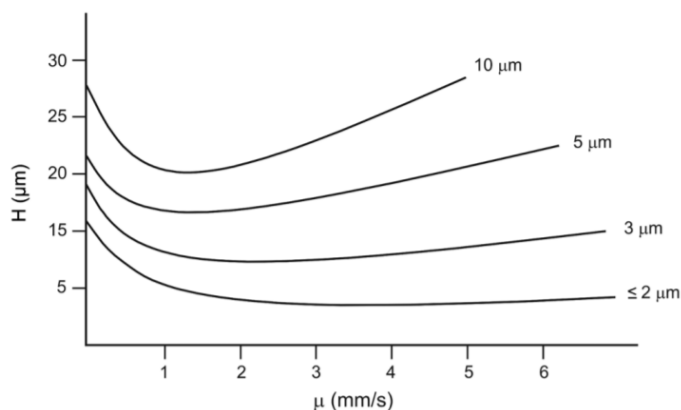
**Figura 4.11:** Esquema representativo dos principais componentes de um sistema de cromatografia líquida (81).

#### 4.6.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

A UPLC é a combinação entre colunas cromatográficas de menores comprimentos preenchidas com partículas de  $1,7\ \mu\text{m}$  de tamanho e um sistema que permite operar a elevadas pressões. A diminuição das partículas está diretamente relacionada com a eficiência da coluna, sendo este princípio governado pela equação de *Van Deemter* (equação 4-9) que descreve a relação entre a velocidade linear (fluxo da fase móvel) e a altura do prato teórico (80,81).

As colunas e o empacotamento utilizados na UPLC ainda são alvo de desenvolvimento, devido ao nível de excelência exigido por estes sistemas. Os principais parâmetros que devem ser considerados durante a escolha de uma coluna cromatográfica consiste na pressão que o sistema suporta, no comprimento e diâmetro da coluna, na fase da coluna (normal ou reversa), no enchimento utilizado e nos tamanhos das partículas e poros.

Na figura 4.11, estão apresentadas as curvas de *Van Deemter* para partículas de 10, 5, 3 e  $\leq 2\ \mu\text{m}$ , que mostram que as partículas  $\leq 2\ \mu\text{m}$  podem reduzir significativamente a altura equivalente do prato teórico resultando numa maior eficiência e achatamento da curva de *Van Deemter* (80).



**Figura 4.12:** Curvas de Van Deemter para partículas de 10, 5, 3 e  $\leq 2 \mu\text{m}$  (80).

As partículas pequenas tendem a permitir trocas do soluto na fase móvel e nos poros das partículas mais rapidamente devido à menor porosidade dos poros. Assim, o soluto gasta um tempo menor entre a fase móvel e a fase estacionária, eluindo em picos estreitos (80).

A diminuição do tamanho da partícula provoca um aumento na pressão do sistema, que pode ser observado pela equação (4-11):

$$P = \Phi x \frac{L\eta u}{100d_p^2} \quad (4-11)$$

Onde,  $P$  é a pressão,  $\Phi$  a resistência ao escoamento,  $L$  o comprimento da coluna (mm),  $\eta$  a viscosidade da fase móvel (mPA/s),  $u$  a velocidade linear (nm/s) e  $d_p$  o diâmetro médio das partículas ( $\mu\text{m}$ ).

É sabido que, pela equação, a redução do tamanho da partícula pela metade acarretará em um aumento da pressão por um fator de quatro. No entanto, a utilização de partículas menores está associada a colunas de menores comprimentos, desta forma, o aumento da pressão não será quatro vezes maior, mas atingirá valores que não são compatíveis com o sistema convencional de HPLC. Por este motivo, foram realizadas modificações nos componentes constituintes de um sistema UPLC com o intuito de se obter o máximo de aproveitamento das vantagens proporcionadas pelo tamanho reduzido das partículas e a fim de se alcançar uma elevada capacidade de separação. As principais modificações num sistema UPLC são as seguintes (80,82):

- Um sistema binário de solventes, com duas bombas individuais e em série para propiciar um fluxo de fase móvel suave e reprodutível de maneira a compensar a compressibilidade do solvente a altas pressões;
- Injetores automáticos com volume de amostra reduzido (0,1-50  $\mu\text{L}$ ) para evitar o espalhamento da amostra e consequente alargamento do pico cromatográfico, uma

vez que, as válvulas de injeções convencionais não foram projetadas para operar em pressões extremas;

- Detetores com elevada taxa de aquisição de forma a conseguir capturar um número suficiente de dados que permitam a integração de um pico do analito de forma reprodutível, dado que este pico pode ter uma largura de pico a meia altura menor que um segundo;
- A utilização de partículas com maior resistência física e mecânica, estáveis a uma grande faixa de pH, e com menor seletividade para os interferentes.

## 4.7 Cromatografia Líquida associada à Espectrometria de Massa

O acoplamento da MS a técnicas cromatográficas sempre foi bem visto devido à natureza sensível e altamente específica deste tipo de detetor quando em comparação a outros detetores disponíveis. Entretanto, o acoplamento LC-MS foi limitado por muitos anos pois a LC é utilizada para a análise de compostos não voláteis sendo a fase móvel um líquido, tornando impossível introduzir os compostos num analisador MS que funciona à base de iões na fase gasosa. Esta situação mudou em 1980 quando Fenn desenvolveu a ionização por *electrospray* (83).

Este tipo de técnica hifenada permite detetar massas características de um composto ou uma classe de compostos. O sistema pode seletivamente detetar compostos de interesse em uma matriz complexa, tornando mais fácil identificar ims em níveis de traço (84).

O LC-MS tornou-se uma ferramenta indispensável em diversas áreas de aplicação fornecendo alta sensibilidade, segurança e produtividade. Quando se utilizam dois analisadores, com uma célula de colisão entre eles, o sistema é denominado *tandem* (LC-MS/MS), onde o primeiro analisador identifica o ião precursor e o segundo analisador os iões produtos, obtendo assim mais informações estruturais do analito e aumentando a seletividade e sensibilidade da técnica (79,83,84).

### 4.7.1 Espectrometria de Massa

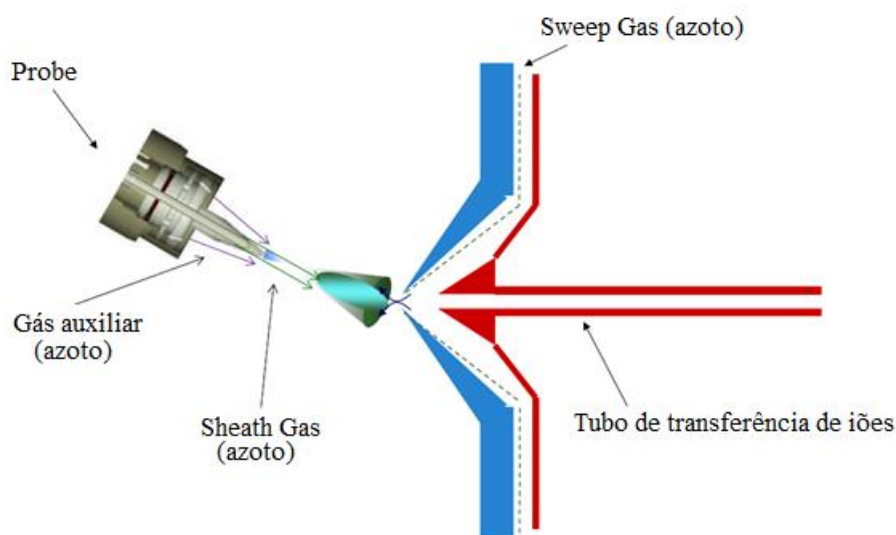
Como já referido anteriormente, um espectrómetro de massa é composto por três partes fundamentais que variam consoante o equipamento. Nesta tecnologia utilizou-se como fonte de iões o mecanismo de ionização por *electrospray* e um analisador de massas do tipo triplo quadrupolo.

De modo a melhorar o entendimento do espectrómetro de massa face às suas funcionalidades, será realizada uma breve descrição dos componentes citados.

#### 4.7.1.1 Fonte de Ionização

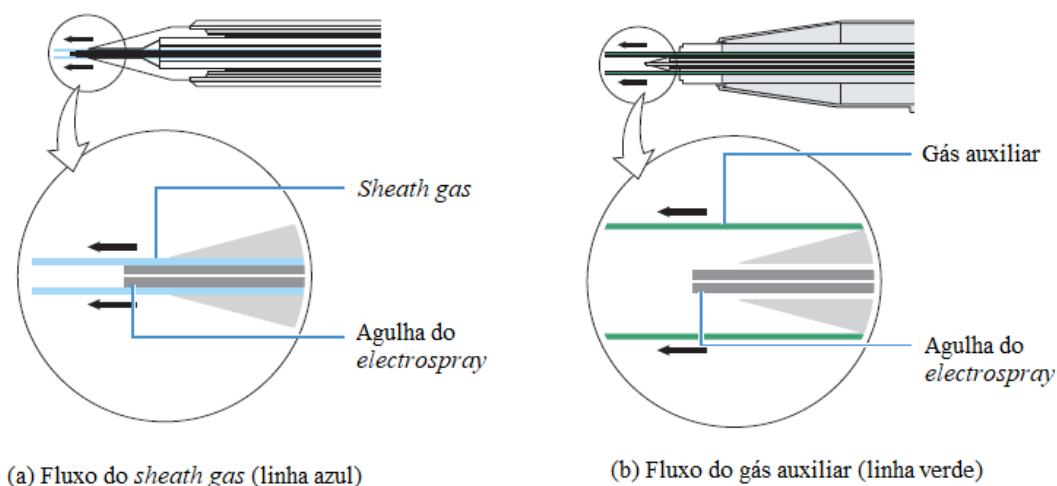
Neste processo, a amostra proveniente da LC é introduzida num tubo capilar em aço inox, ao qual é aplicada uma voltagem entre 3000 e 5000 V, levando à formação de um campo elétrico que originará a separação eletroforética de cargas positivas e negativas na solução (51,60).

A figura 4.12 mostra o desenho básico da interface do equipamento utilizado para a ionização via *electrospray*, onde a saída da coluna encontra-se conectada à sonda (*probe*), formada por um tubo capilar de metal circundado por um fluxo de gás nebulizador (geralmente N<sub>2</sub>). A aplicação, na ponta do capilar, de uma diferença de potencial resulta na formação de gotículas enriquecidas com iões positivos ou negativos que emergem do capilar na forma de um aerossol (78,79).



**Figura 4.13:** Esquema do processo de ionização por *electrospray* (adaptado de 64).

O solvente é então evaporado com o auxílio do aquecimento da sonda para facilitar a dessolvatação, fazendo com que as gotículas diminuam sucessivamente de tamanho e aumentem a repulsão eletrostática entre as cargas até que os iões do analito evaporem e sejam direcionados para o cone (78,79). Enquanto o *sheath gas* nebuliza a solução da amostra em uma névoa fina à medida que esta sai da agulha do *electrospray*, o gás auxiliar ajuda a evaporar a solução e focaliza a trajetória dos iões até ao cone, evitando perdas (85,86). O fluxo do *sheath gas*, bem como do gás auxiliar, estão representados na figura 4.13.



**Figura 4.14:** Fluxo do *sheath gas* e do gás auxiliar utilizados na fonte de ionização (adaptado de (86)).

Os iões formados seguem então para o tubo de transferência. Este encontra-se aquecido de maneira a eliminar quaisquer vestígios de solvente remanescente. Um terceiro gás (*sweep gas*) flui por trás do cone e atua como uma barreira física protegendo a entrada do tubo de transferência de possíveis interferentes. O resultado do uso deste tipo de gás reverbera no aumento significativo de amostras analisadas sem a perda da intensidade do sinal, diminuindo ainda a necessidade de manutenção da fonte de ionização (86).

Os mecanismos de formação dos iões na fase gasosa não são completamente compreendidos. Os dois mecanismos mais aceites para explicar o fenómeno são o proposto por Dole, em 1968, conhecido como modelo de carga residual, e o proposto por Iribarne e Tomson, em 1976, conhecido como modelo de evaporação do ião (78).

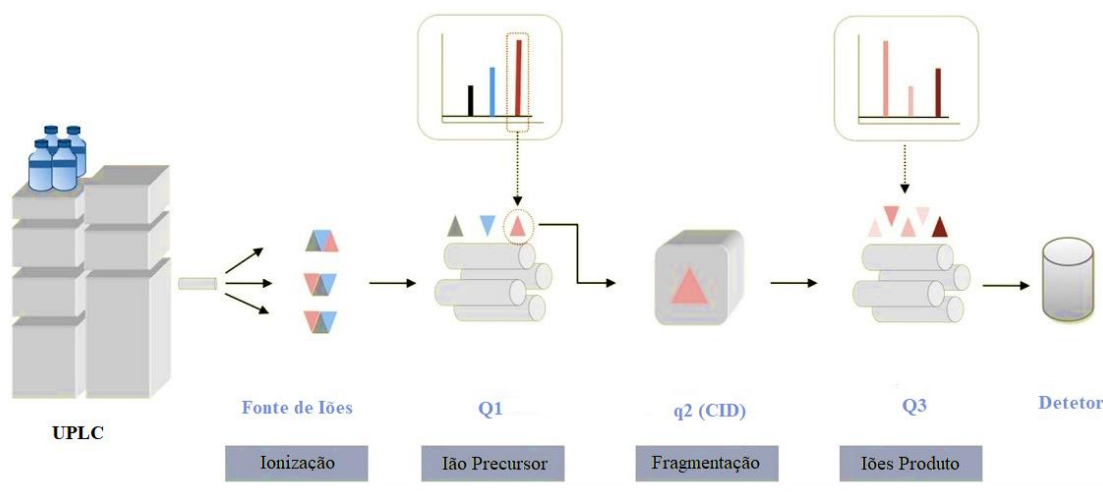
De acordo com Dole, as gotículas sofrem evaporação contínua até que tenha ocorrido a total dessolvatação das moléculas, levando à formação de um ião isolado. O outro modelo proposto por Iribarne e Tomson, considera que, com a evaporação as gotas de solvente atingem um determinado raio em que a densidade elétrica na superfície é suficientemente elevada para expulsar os analitos para fora da gota, não havendo a rutura da gota, mas sim a desadsorção dos iões para a fase gasosa (79).

Durante o processo de ionização por *electrospray*, três tipos de iões podem ser gerados: iões moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas e aductos. A extensão com a qual cada um destes iões é formado pode ser compreendida em termos do balanço entre três processos distintos que ocorrem no interior do capilar: reações de oxidação e redução (redox), que produzem iões moleculares; reações ácido/base, que resultam na formação de moléculas protonadas ou desprotonadas e, coordenação com catiões ou aniões, levando à formação de aductos (87).

#### 4.7.1.2 Analisador de Massas

O presente trabalho teve como particularidade a utilização da técnica de espectrometria de massas sequencial (MS/MS). Esta difere da técnica convencional pelo facto de recorrer a mais do que um nível de análise de massas (analisador). O tipo de configuração MS/MS utilizada consistiu em um sistema do tipo triplo quadrupolo, ou seja, a junção de três quadrupolos em série, onde dois analisadores do tipo quadrupolo são separados por uma célula de colisão.

O funcionamento deste analisador de massas dá-se pela seleção de um ião, denominado ião precursor, no primeiro quadrupolo (Q1) após a ionização dos analitos. De seguida, o ião selecionado segue para uma célula (q2) de dissociação induzida por colisão (CID), onde é introduzido um gás inerte de colisão em uma determinada pressão que provocará colisões com o ião precursor, gerando diversos iões produto que seguem para o terceiro quadrupolo (Q3). Os iões produtos gerados na célula de colisão serão separados por uma variação da voltagem de radiofrequência no terceiro quadrupolo, avançando para o detetor. O espectrómetro de massa triplo quadrupolo é projetado para funcionar em quatro modos de aquisição: *precursor ion scan*, *neutral loss scan*, *product ion scan* ou em modo MRM/SRM (do inglês, *Multiple Reaction Monitoring*, também conhecido como *Selected Reaction Monitoring*) (79,88). Na figura 4.13, encontra-se representado o modo de funcionamento de um triplo quadrupolo no modo MRM/SRM.



**Figura 4.15:** Representação de um sistema LC-MS/MS com analisador do tipo triplo quadrupolo em modo de operação MRM/SRM (adaptado de (89)).

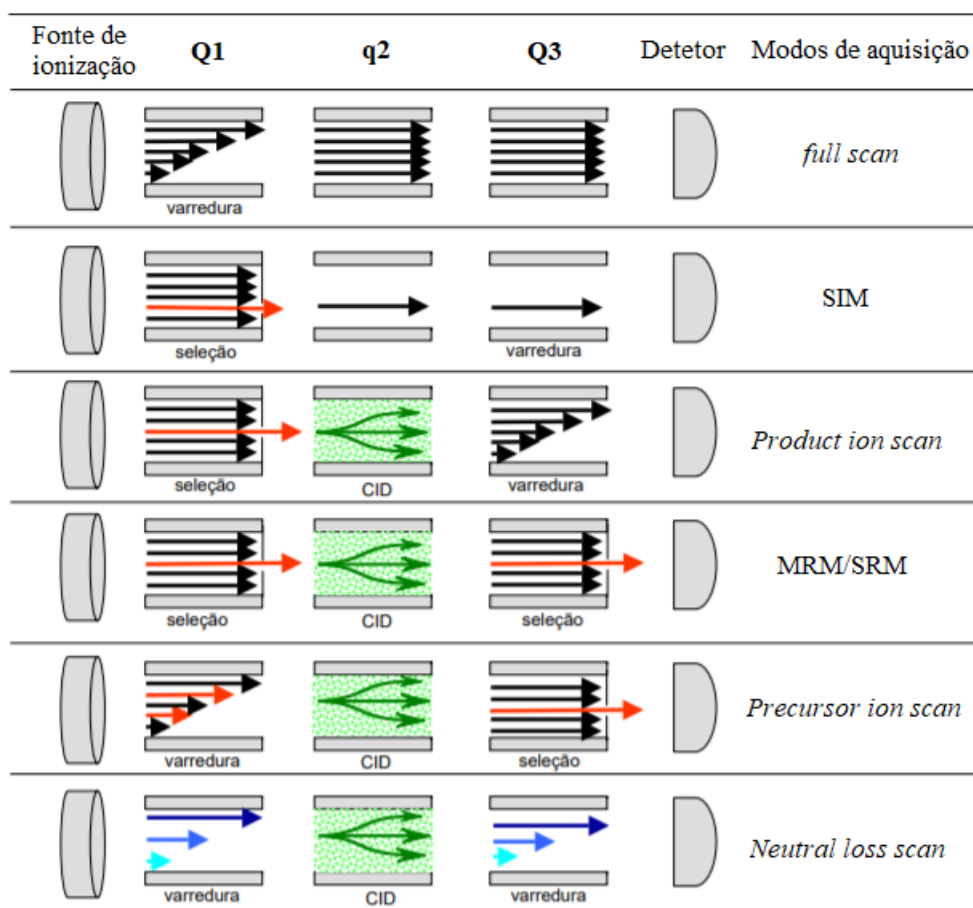
O modo de aquisição *precursor ion scan* é utilizado quando um grupo de compostos gera um mesmo fragmento de ião precursor. Neste caso, o quadrupolo (Q3) é programado para permitir somente a passagem de um ião fragmento precursor com determinada razão  $m/z$ , enquanto que, o quadrupolo (Q1) opera em *full scan*. Somente os compostos que originam um fragmento de ião

precursor desejado são detetados. O modo *product ion scan* funciona exatamente de maneira contrária ao *precursor ion scan*, dado que, o alvo de análise nessa operação consiste em determinar todos os iões produtos resultantes da célula de colisão. Desta forma, o quadrupolo (Q1) irá operar em modo SIM, permitindo apenas a passagem de um ião precursor com determinada razão  $m/z$ , e o quadrupolo (Q3) em modo *full scan*, possibilitando a determinação dos iões produtos resultantes da fragmentação do ião precursor (90).

O modo *neutral loss scan* é utilizado quando se deseja analisar compostos que possuem uma perda neutra em comum, como, por exemplo, a perda de uma molécula de água. Assim sendo, ambos os quadrupolos (Q1 e Q3) funcionam em modo *full scan* com uma diferença de razão  $m/z$  fixada, e somente fragmentos que possuem essa perda específica são detetados (90).

Na análise dos pesticidas e fármacos em águas de consumo é importante trabalhar com o máximo de seletividade e sensibilidade possíveis, pelo que o modo de operação selecionado para a validação do método analítico e posterior análise em rotina foi o modo MRM/SRM, que permite a focagem nos iões precursores e produto por maiores períodos de tempo. Neste modo de aquisição, os quadrupolos (Q1 e Q3) trabalham em modo SIM, selecionando e focando iões de razão  $m/z$  específicas. Com o modo de operação MRM selecionado, é necessário a escolha de pelo menos duas transições ião precursor-ião produto (MRM1 e MRM2), a qual uma será utilizada para a quantificação e a segunda para a confirmação qualitativa do composto (79).

Os modos de aquisição podem ser melhores compreendidos através da figura 4.14.



**Figura 4.16:** Modos de aquisição utilizados em analisadores do tipo triplo quadrupolo (adaptado de (91)).

## 4.8 Efeito da Matriz

Apesar das inúmeras vantagens já abordadas da análise realizada por LC-MS/MS, um importante fator que deve ser levado em consideração no desenvolvimento do método, validação e trabalho em rotina, é a supressão/enriquecimento iônico. Este fenômeno é um dos efeitos da matriz de ocorrência mais comum devido à presença simultânea de mais de um componente na fonte de ionização, podendo resultar em competição no processo de formação de íons e uma subsequente redução nos sinais provenientes dos detetores de massa, levando a resultados poucos confiáveis em análises quantitativas (79,83).

O mecanismo e a origem do efeito da matriz não são totalmente compreendidos, existem muitas fontes possíveis para este fenômeno, incluindo a presença de compostos endógenos na matriz, bem como substâncias exógenas, e moléculas provenientes de contaminação durante a preparação da amostra. Fatores como alta concentração, massa, basicidade e eluição na mesma janela de retenção



que o analito de interesse tornam o composto um principal candidato a induzir a supressão iônica (92–94).

Diferentes mecanismos foram propostos para explicar a supressão iônica, a maioria dos quais específicos para a técnica de ionização utilizada. No caso da ionização por *electrospray*, compostos polares com altas concentrações ( $>10^{-5}$  M) perdem a resposta linear devido à competição pelas cargas disponíveis e pelo acesso à superfície da gota entre o analito e os componentes da matriz (94).

Outra teoria considera os efeitos do aumento da viscosidade e da tensão superficial das gotículas devido à presença de compostos interferentes em altas concentrações, reduzindo assim a evaporação do solvente e a capacidade do analito em atingir a fase gasosa.

Da mesma forma, a presença de materiais não voláteis podem causar a supressão iônica ao diminuir a eficiência da formação de gotículas por meio da coprecipitação do analito ou ao evitar que as gotículas atinjam o raio crítico necessário para que os iões da fase gasosa sejam emitidos.

Em geral, aperfeiçoar a preparação da amostra e a seletividade cromatográfica são as duas formas mais eficazes de contornar a supressão de iões. Os métodos tradicionais de pré-tratamento de amostra para separações por cromatografia líquida envolvem a partição entre solventes imiscíveis, como na extração líquido-líquido (LLE), ou aprisionamento em um suporte de fase sólida, como na extração em fase sólida (SPE). A SPE tem a capacidade de eliminar interferentes da amostra, resultando em extratos mais limpos (94).

A modificação da força da fase móvel ou das condições do gradiente, é uma das maneiras mais fáceis e eficientes de alterar a seletividade cromatográfica, levando em consideração que mudanças na fase móvel podem gerar oscilações drásticas de seletividade no equipamento. Também, relacionado à química da fase móvel, está o uso de aditivos e tampões para auxiliar na separação e melhorar o desempenho cromatográfico. No entanto, estes podem causar a supressão do sinal no *electrospray* ou a contaminação do espectrómetro de massa. Embora, comparativamente menos eficaz no ajuste da seletividade, uma mudança da fase estacionária também pode ser usada (94).

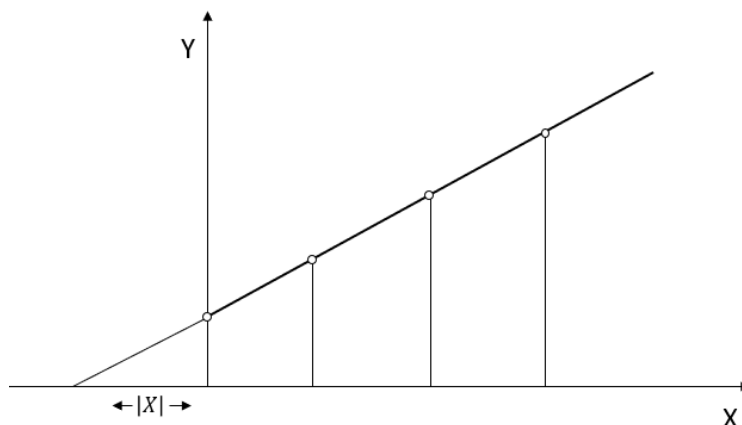
Quando os fenômenos de supressão/enriquecimento iônico não podem ser eliminados, algumas técnicas de calibração devem ser realizadas para compensar estes efeitos de matriz.

O método da adição de padrão (matriz ajustada) é uma técnica de calibração utilizada quando a composição da amostra (matriz) afeta a medição da propriedade física da técnica instrumental. Trata-se de um mesmo extrato da amostra enriquecido com a solução padrão em diferentes níveis de concentração. Apesar deste método mostrar-se muito eficaz, o mesmo não pode ser utilizado para compensar a eficiência de extração ou interferências cromatográficas. A concentração do composto alvo presente na amostra é obtido através da aplicação da equação 4-12, pelo que é essencial a existência de uma resposta linear no intervalo de concentrações utilizado (4).

$$x = \frac{\text{ordenada na origem} - y}{\text{declive}} \quad (4-12)$$

Onde,  $x$  é a concentração do analito na amostra e  $y$  o sinal obtido pela leitura do branco.

Na figura 4.16, está representado uma típica resposta linear obtida no método da adição de padrão.



**Figura 4.17:** Método da adição de padrão (adaptado de (4)).

Outra técnica muito utilizada consiste na calibração analítica com o uso de padrões internos. Um padrão interno (PI) é um composto químico adicionado numa determinada concentração a uma amostra ou a um extrato da amostra, de modo a avaliar a correta execução do método de ensaio e a minimizar erros sistemáticos e aleatórios.

O padrão interno a selecionar para um método de ensaio deve obedecer a vários requisitos. Sugere-se que se use, sempre que possível, um padrão interno marcado isotopicamente, com a mesma estrutura química e a mesma composição química do composto em análise, mas em que um ou mais átomos da molécula do composto em análise é substituído por isótopos (deutério,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{18}\text{O}$ , por exemplo). O PI não deve estar presente na amostra em análise.

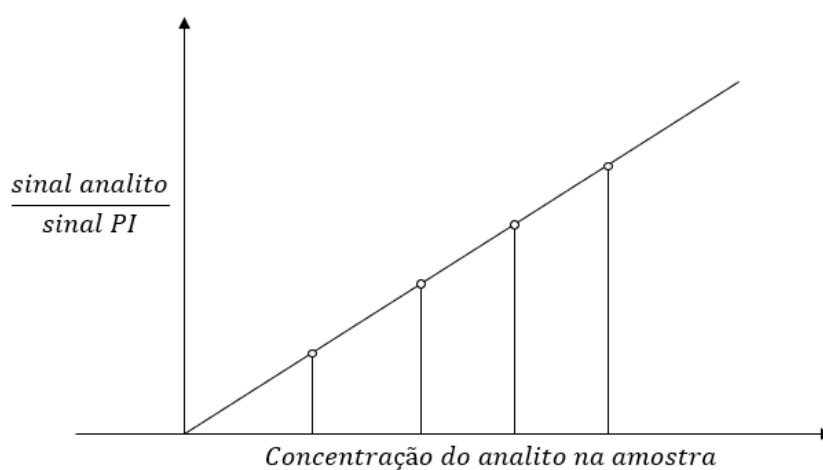
Um PI adicionado ao extrato de uma amostra é designado por padrão interno de injeção. O seu uso tem como finalidade minimizar erros de injeção num cromatógrafo, como é o caso de variações do volume de injeção. O efeito de matriz deverá ser semelhante entre o padrão interno de injeção e os compostos em análise. No caso de métodos de ensaio com espectrómetros de massa, o padrão interno de injeção também é usado para minimizar a variabilidade de sinal provocado pelas diferentes matrizes na fonte de ionização.

Um padrão interno adicionado à amostra é designado por “*surrogate*”. O seu uso tem como finalidade avaliar e minimizar fontes de erro que ocorrem na fase da preparação da amostra. O “*surrogate*” deverá ter propriedades químicas e comportamento analítico semelhante às dos

compostos em análise. Por outras palavras, a percentagem de recuperação e o efeito de matriz deverá ser semelhante para o “*surrogate*” e para os compostos em análise.

Numa análise multiresíduos em que o método de ensaio envolve a análise de vários compostos pode ser necessário o uso de vários “*surrogate*” (95).

A figura 7.17, apresenta uma típica resposta linear obtida no método da calibração analítica com o uso de padrões internos.



**Figura 4.18:** Calibração analítica com o uso de padrão interno.

## Capítulo 5 – Validação do Método Analítico

### 5.1 Nota Introdutória

Um método de ensaio é um processo suscetível à acumulação de erros (sistemáticos e/ou aleatórios) que podem alterar de maneira significativa o valor do resultado final.

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos, para demonstrarem, através da validação, que os métodos internos de ensaio executados, conduzam a resultados fiáveis e interpretáveis adequados à qualidade pretendida.

Quando se pretende validar um método interno de ensaio, desenvolvido ou adaptado no laboratório, ter-se-á de efetuar o estudo de parâmetros antes de o introduzir em rotina. Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento dos seguintes parâmetros: sensibilidade, linearidade, gama de trabalho, limiares analíticos, precisão e exatidão (95,96).

### 5.2 Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método, ou equipamento, em distinguir pequenas diferenças de concentração em um analito ou determinar pequenas concentrações do analito na amostra (96).

Este parâmetro pode ser definido pela expressão (5-1) como o quociente entre o acréscimo do valor lido  $\Delta L$  e a variação da concentração  $\Delta C$  correspondente a esse acréscimo, podendo ser expressa através do declive de uma reta de calibração (polinómio de grau 1).

$$Sensib. = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (5-1)$$

### 5.3 Seletividade

A seletividade refere-se à capacidade de um método em identificar e distinguir um analito em particular presente em uma mistura complexa sem que haja a interferência de outros componentes presentes na matriz da amostra.

Um método é considerado seletivo quando é possível discriminar um analito de interesse face a outras substâncias presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantia de que a grandeza provém apenas do analito.

Um método é considerado específico quando ele é 100% seletivo.

Para um método ser considerável aplicável (específico e seletivo) na prática, os ensaios de recuperação devem ter taxas de recuperação próximas a 100%. Porém, o êxito das taxas de recuperações depende, obviamente, do tipo de metodologia praticada. Caberá ao laboratório definir os critérios de aceitação relativos às taxas de recuperações alcançadas (25,96).

## 5.4 Precisão

A dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas, é avaliado pela precisão. A precisão de um procedimento analítico é geralmente expressa através do desvio padrão absoluto ( $s$ ) ou pelo coeficiente de variação (CV) de uma série de medições (79,96).

O desvio padrão absoluto é dado pela equação (5-2).

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (5-2)$$

Em que  $\bar{x}$  é a média aritmética de um número  $n$  de medições,  $x_i$  é o valor individual de uma medição e  $n$  representa o número de medições.

Se a precisão for expressa através do coeficiente de variação (CV), este é dado pela equação (5-3):

$$CV (\%) = \left( \frac{s}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad (5-3)$$

A avaliação da precisão é realizada através de ensaios de repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade, levando em consideração que fatores como o operador, o equipamento, a calibração do equipamento, ambiente e tempo entre as medições (79).

### 5.4.1 Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, tais como o mesmo laboratório, analista, equipamento, reagentes e curtos intervalos de tempo. O resultado deste ensaio pode ser expresso através do coeficiente de variação (79,96).

### 5.4.2 Precisão Intermédia

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e tem por objetivo verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados, relativos a diferença de analistas, equipamentos, épocas e calibração, mas definindo exatamente quais as condições a variar. A precisão intermédia pode ser expressa através do coeficiente de variação (79,96).

### 5.4.3 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade refere-se à precisão obtida fazendo variar todas as condições de medição (diferentes laboratórios, operadores, equipamentos e condições de análise) sobre a mesma amostra. A reprodutibilidade de um método é obtida a partir de ensaios interlaboratoriais (79,96).

## 5.5 Exatidão

O termo exatidão é definido pela concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro. Quando aplicado a uma série de resultados de ensaio implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos.

Para avaliar a exatidão o laboratório deve participar em ensaios interlaboratoriais de aptidão (EIL) ou utilizar sempre que possível Materias de Referência Certificados (MRC). Caso não existam MRC ou ensaios EIL, devem ser usados meios alternativos de avaliar a exatidão ou evidenciar a comparabilidade dos resultados com outros laboratórios, como:

- Uso de padrões internacionais ou nacionais, devidamente reconhecidos pelo setor técnico;

- Comparação com métodos de referência (testes comparativos);
- Ensaios de recuperação do analito.

## 5.6 Quantificação

De forma a interpretar as informações obtidas pelos estudos realizados, é necessário proceder à determinação de parâmetros como as curvas de calibração e os limiares analíticos do método de ensaio.

### 5.6.1 Curvas de Calibração

Em análises quantitativas, a calibração indica um processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Em métodos instrumentais de análise, a calibração analítica do equipamento inicia-se com a preparação de soluções padrão, em que a concentração do parâmetro a dosear é conhecida. Estas soluções são medidas num equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras a analisar. De seguida, procede-se à construção da curva de calibração (sinal do equipamento em função da concentração) a partir da qual é possível determinar, por interpolação, a concentração do analito na amostra (95).

Os critérios para aceitação das curvas de calibração relativos à linearidade e à estabilidade entre as calibrações devem ser estabelecidos. Para isto, a recomendação é que as calibrações analíticas devem ser realizadas de acordo com a norma ISO 8466-1, de forma a obter-se regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados, descrito no anexo 3. Este método define que no eixo das ordenadas se representa a resposta instrumental do equipamento e que o valor da concentração das soluções padrão se encontra expresso no eixo das abcissas. Para funções de calibração não linear (polinómio de grau 2) deve-se utilizar como referência a norma ISO 8466-2, descrita no anexo 8 (97,98).

### Gama de Trabalho

A gama de trabalho de um método analítico corresponde ao intervalo compreendido entre a concentração mais baixa e a concentração mais alta do analito, onde foi demonstrado que o procedimento analítico possui uma boa linearidade, precisão e exatidão (97).

## Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade que o método apresenta para fornecer resultados de ensaio diretamente proporcionais à concentração de analitos nas amostras numa determinada gama de trabalho. A linearidade pode ser avaliada através de modelos estatísticos, nomeadamente o teste de Mandel, análise de resíduos ou o teste de RIKILT (97,99).

### 5.6.2 Limiares Analíticos do Método de Ensaio

Quando são realizadas análises em amostras com baixos teores de analito, é importante conhecer o menor valor de concentração do analito que pode ser detetado e quantificado pelo método.

Os limites inferiores da curva de calibração são concentrações que indicam a capacidade de deteção e quantificação do método analítico a esse nível de concentração (25,79).

#### Limite de Deteção (LOD)

O limite de deteção é a menor concentração do analito que pode ser estatisticamente detetada, mas não necessariamente quantificada, uma vez que a quantificação a este nível está sujeita a erros significativos (95).

Em termos quantitativos o limite de deteção é obtido por diversas metodologias (95):

— Avaliação do nível de ruído em sistemas cromatográficos (razão sinal-ruído)

O nível de ruído pode ser determinado através da análise de um determinado segmento da linha de base próximo ao tempo de retenção dos compostos a analisar. O segmento do cromatograma escolhido para análise tem em conta a reprodutibilidade dos tempos de retenção e a variabilidade da linha de base do sistema analítico. O cálculo do nível de ruído deve ser efetuado usando, no segmento escolhido, matrizes complexas que não contenham os compostos em análise e deve-se proceder da seguinte forma:

- a) O segmento escolhido do cromatograma não deve conter picos interferentes;
- b) Efetua-se a medição do ruído, utilizando o método RMS (do inglês, *root mean square*), em pelo menos três cromatogramas;
- c) O valor do ruído de cada segmento cromatográfico será atribuído a qualquer composto que tenha um tempo de retenção dentro desse segmento;



- d) Usa-se o valor médio do ruído desse segmento (em altura, área ou milivolt) para o cálculo do limite de detecção. Multiplica-se esse valor por 3 e converte a resposta em concentração.

— Análise de brancos de matriz fortificados

Através de uma série de amostras de branco de matriz, representativas e independentes, fortificadas com uma concentração baixa do composto em causa, o limite de detecção pode ser calculado através da equação 5-4:

$$LOD = 3 \times S_{x0} \quad (5-4)$$

onde,  $S_{x0}$  é a estimativa do desvio padrão de várias leituras do branco da amostra ou da solução com a concentração mais baixa da gama de linearidade.

— Análise estatística numa calibração linear

Caso o método analítico envolva a utilização de uma curva de calibração, o limite de detecção pode ser calculado através do desvio padrão residual da reta de calibração, que é definido pela equação 5-5:

$$LOD = \frac{|3 \times S_{y/x}|}{b} \quad (5-5)$$

onde,  $S_{y/x}$  é o desvio padrão residual da curva de calibração e  $b$  o seu declive.

— Análise numa calibração não linear

Se o método analítico envolver a utilização de uma calibração não linear (polinómio de grau 2), o limite de detecção pode ser calculado através do desvio padrão residual da curva de calibração, que representa o desvio padrão de um branco. Neste caso o cálculo deve ser realizado a partir da equação 5-6:

$$LOD = \frac{|3 \times S_{y/x}|}{E} \quad (5-6)$$

onde,  $E$  é o declive (tangente) da função de calibração não linear no ponto central ( $\bar{x}$ ) da gama de trabalho.

### Limite de Quantificação (LOQ)

O limite de quantificação corresponde ao menor valor de concentração do analito a partir do qual é possível a quantificação do analito, com adequada precisão e exatidão, utilizando um determinado procedimento experimental.

O limite de quantificação pode ser calculado pelos mesmos métodos referidos para o limite de detecção, mas com as seguintes alterações (95):

— Avaliação do nível ruído em sistemas cromatográficos (razão sinal-ruído)

Multiplica-se a razão sinal-ruído por 10 e converte esse valor em concentração.

— Análise de brancos de matriz fortificados

O limite de quantificação pode ser calculado a partir da equação 5-7:

$$LOQ = 10 \times S_{x0} \quad (5-7)$$

onde,  $S_{x0}$  é o desvio padrão correspondente a várias leituras do branco ou da solução com concentração mais baixa da gama de linearidade.

— Análise estatística duma calibração linear

Da mesma forma que foi citado para o limite de detecção, se o método analítico envolver a utilização de uma calibração linear, o limite de quantificação poderá ser calculado através do desvio padrão residual da curva de calibração, a partir da expressão 5-8:

$$LOQ = \frac{|10 \times S_{y/x}|}{b} \quad (5-8)$$

— Análise estatística duma calibração não linear

O limite de quantificação pode ser calculado através do desvio padrão residual de uma calibração não linear (polinómio de grau 2) através da equação 5-9:

$$LOQ = \frac{|10 \times S_{y/x}|}{E} \quad (5-9)$$

## Capítulo 6 – Parte Experimental

### 6.1 Determinação Quantitativa de Pesticidas por GC/MS

#### 6.1.1 Equipamento e Material

##### 6.1.1.1 Equipamento

- Cromatógrafo gasoso, modelo TRACE 1300, Thermo Scientific, equipado com:
  - AI/AS 1310 autosampler, Thermo Scientific
  - *Software* Chromeleon versão 7.2.10
- Espectrómetro de massa (quadrupolo), modelo ISQ 7000, Thermo Scientific
- Balança Analítica, modelo XS204, Mettler Toledo
- Agitador Vortex, modelo MS3 digital, IKA

##### 6.1.1.2 Material

Nesta secção descreve-se o material específico utilizado na aplicação desta metodologia, não sendo referidos materiais de uso corrente de laboratório.

- Coluna capilar HP-5MS (5% metilfenilpolisiloxano, 95% dimetilpolisiloxano), 60m×0.25mm×0.25µm
- Vials de 1.5 mL, VWR International
- Seringa eletrónica de 100 µL e 500 µL, modelo eVol® XR, SGE Analytical Science

#### 6.1.2 Reagentes

##### 6.1.2.1 Reagentes Gerais

- Água Ultra Pura
- Diclorometano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, *p.a.*, ≥ 99,95%, Carlo Herba Reagents

- Metanol, CH<sub>3</sub>OH, Lichrosolv ®, *p.a.*, ≥ 99,9% Carlo Herba Reagents

### 6.1.2.2 Padrões Primários

- Dimoxistrobina, C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Pestanal ®, *p.a.*, ≥ 98 %, Sigma-Aldrich
- Famoxadona, C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, Pestanal ®, *p.a.*, ≥ 95 %, Sigma-Aldrich
- Ipconazol, C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>3</sub>O, AR, *p.a.*, ≥ 98,85 %, Dr. Enrenstorfer
- Imazalil, C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O, Pestanal ®, *p.a.*, ≥ 98%, Sigma-Aldrich
- Penconazol, C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, Pestanal ®, *p.a.*, ≥ 98%, Sigma-Aldrich
- Prochloraz, C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, Pestanal ®, *p.a.*, ≥ 98%, Sigma-Aldrich
- Tetraconazol, C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>2</sub>F<sub>4</sub>N<sub>3</sub>O, Pestanal ®, *p.a.*, ≥ 98%, Sigma-Aldrich

### 6.1.3 Preparação de Soluções

A preparação das soluções para análise seguiram o protocolo do método de ensaio, utilizado em rotina pela EPAL, para a determinação quantitativa de um conjunto de pesticidas por GC/MS, e encontram-se pormenorizados a seguir.

#### 6.1.3.1 Solução Mãe de Pesticidas

Para as soluções mãe, cerca de 0,02 g de cada pesticida foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 50 mL. Dissolver o pesticida e completar o volume em metanol. Estas soluções foram armazenadas em um frigorífico, ao abrigo da luz, a uma temperatura entre 2 a 8 °C.

A tabela 6.1 apresenta a concentração de cada solução mãe, sendo estas corrigidas pela pureza de cada composto.

**Tabela 6.1:** Concentração das soluções mãe de pesticidas para análise por GC/MS.

Pesticida	Massa de Padrão pesada (g)	Pureza ( % )	Volume Final ( mL )	Concentração ( mg/L )
Tetraconazole	0,1000	98,00	50	1960
Dimoxistrobina	0,0204	98,00	50	400
Penconazole	0,0201	98,00	50	394
Imazalil	0,0203	98,00	50	398
Prochloraz	0,0201	98,00	50	394
Ipconazole	0,0202	98,85	50	399

### 6.1.3.2 Solução Padrão Conjunta de Pesticidas

Para a preparação das soluções conjuntas foi transferida, com ajuda de uma seringa eletrônica, a quantidade necessária de cada uma das soluções mãe, para um balão volumétrico de 100 mL e diluiu-se em diclorometano, de forma a obter aproximadamente as concentrações de cada pesticida descritas na tabela 6.2.

**Tabela 6.2:** Concentração da solução padrão conjunta de pesticidas para análise por GC/MS.

Pesticida	Concentração Solução Mãe (mg/L)	Volume ( mL )	Volume Final ( mL )	Concentração ( mg/L )
Tetraconazole	1960	0,19	100	3,7
Dimoxistrobina	400	0,95	100	3,8
Penconazole	394	0,94	100	3,7
Imazalil	398	0,95	100	3,8
Procloraz	394	0,95	100	3,7
Ipconazole	399	0,95	100	3,8

### 6.1.3.3 Soluções Padrão para Validação da Gama de Trabalho

#### 6.1.3.3.1 Solução Padrão Intermédia para Estudo da Linearidade

A solução padrão intermédia para estudo da linearidade foi preparada transferindo 2 mL da solução conjunta de pesticidas (6.1.3.2), para um balão volumétrico de 20 mL e perfazer o volume em diclorometano.

#### 6.1.3.3.2 Soluções Padrão de Trabalho para Estudo da Linearidade

As soluções padrão de trabalho dos pesticidas usadas para o estudo da linearidade do método analítico foram preparadas por diluição da solução padrão intermédia para validação (6.1.3.3.1) em diclorometano. Para este estudo foram preparadas sete soluções padrões de trabalho com diferentes concentrações, como pode ser observado na tabela 6.3.

**Tabela 6.3:** Concentração das soluções padrão de trabalho dos pesticidas para validação do método analítico por GC/MS.

Pesticida	Concentração Solução Intermédia (µg/L)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
					(µg/L)			
Tetraconazole	372,4	18,6	29,8	44,7	59,6	74,5	119,2	163,9
Dimoxistrobina	379,9	19,0	30,4	45,6	60,8	76,0	121,6	167,1
Penconazole	370,3	18,5	29,6	44,4	59,3	74,1	118,5	162,9
Imazalil	378,0	18,9	30,2	45,4	60,5	75,6	121,0	166,3
Procloraz	374,3	18,7	29,9	44,9	59,9	74,9	119,8	164,7
Ipconazole	379,4	19,0	30,4	45,5	60,7	75,9	121,4	166,9

**Nota:**

**Solução padrão de trabalho P1** – Diluir 1 mL da solução padrão intermédia para um balão volumétrico 20 mL;

**Solução padrão de trabalho P2** – Diluir 0,8 mL da solução padrão intermédia para um balão volumétrico de 10 mL;

**Solução padrão de trabalho P3** – Diluir 1,2 mL da solução padrão intermédia para um balão volumétrico de 10 mL;

**Solução padrão de trabalho P4** – Diluir 1,6 mL da solução padrão intermédia para um balão volumétrico de 10 mL;

**Solução padrão de trabalho P5** – Diluir 1 mL da solução padrão intermédia para um balão volumétrico de 5 mL;

**Solução padrão de trabalho P6** – Diluir 1,6 mL da solução padrão intermédia para um balão volumétrico de 5 mL;

**Solução padrão de trabalho P7** – Diluir 2,2 mL da solução padrão intermédia para um balão volumétrico de 5 mL.

## 6.1.4 Método Analítico GC/MS

### 6.1.4.1 Condições Cromatográficas

Iniciou-se o trabalho em modo *full scan* para verificar os tempos de retenção e a resolução cromatográfica de cada composto por injeção direta através da preparação de vials que continham 20 µL de cada solução mãe diluídos em 980 µL de diclorometano. Para a famoxadona, foi preparado um vial contendo 200 µL da solução mãe e 800 µL de diclorometano.

As condições definidas para o GC/MS encontram-se descritas nas tabelas 6.4, 6.5 e 6.6.

**Tabela 6.4:** Condições cromatográficas da análise por GC/MS.

Modo de Injeção	<i>Splitless</i>
Gás de arraste	<b>Hélio</b>
Temperatura do Injetor	250 °C
<b>Fluxo</b>	<b>1 mL/min</b>
Tipo de Coluna	HP-5MS (60m x 0,25 mm x 0,25µm)

**Tabela 6.5:** Programa de temperaturas do forno da análise por GC/MS.

Tempo de Corrida (min)	Gradiente (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de aquecimento (min)
1	0	40	1
4,6	50	170	1
47,6	1	190	3
69,6	20	250	19

**Tabela 6.6:** Condições do espectrómetro de massa.

<b>Condições do detetor em <i>full scan</i></b>	
Fonte de Ionização	Electroionização
Temperatura da fonte de ionização	230 °C
Energia de Ionização	45 eV
Tipo de Analisador	MS-Quadrupolo
Intervalo de Massas	50-500 m/z

Após a determinação dos tempos de retenção de cada composto, procedeu-se à injeção da solução padrão conjunta, descrita em 6.1.3.2, para o estudo do comportamento dos pesticidas em conjunto, utilizando as mesmas condições referidas anteriormente.

#### 6.1.4.2 Condições do Espectrómetro de Massa

Com o objetivo de definir um método cromatográfico no modo SIM, analisaram-se os espectros de massa obtidos através da injeção individual dos compostos para a escolha dos iões m/z representativos. Esta escolha foi realizada com base nos espectros de massa obtidos em comparação com os espectros de massa respetivos existentes na biblioteca de espectros (NIST) e com dados obtidos de outros estudos publicados.

Após escolhidos os iões m/z, definiram-se os intervalos de tempo para a monitorização de cada composto de acordo com os tempos de retenção obtidos pela injeção da solução padrão conjunta. A tabela 6.7 descreve as condições definidas para a aquisição de dados no modo SIM.

**Tabela 6.7:** Programa de aquisição de dados no modo SIM.

<b>Tempo de Corrida (min)</b>	<b>Compostos</b>	<b>Iões monitorizados (m/z)</b>	<b>Dwell time (seg)</b>
40	Tetraconazol	171, 336*	0,1; 0,1
44.9	Penconazol	159*, 248	0,1; 0,1
51	Imazalil	173*, 215	0,1; 0,1
57	Dimoxistrobina	116, 205*	0,1; 0,1
60.5	Procloraz	180*, 308	0,1; 0,1
62	Ipconazol	83, 125*	0,1; 0,1

Os iões assinalados com \* foram utilizados como iões de quantificação, sendo os outros iões de qualificação. O *Dwell time* corresponde à quantidade de tempo em que o instrumento está coletando os dados para uma transição específica. Quanto maior for o valor do *Dwell time*, maior será a sensibilidade e a precisão do método, mas o número de transições de massa que podem ser monitoradas num determinado ensaio diminuirá.



### 6.1.5 Validação do Método Analítico GC/MS

Para proceder à validação do método cromatográfico, foram analisadas as sete soluções padrão de trabalho. Os resultados obtidos foram tratados através de uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados (anexo 3), de acordo com a norma ISO 8466-1, obtendo-se uma reta de calibração (área vs concentração). A estes resultados foram aplicados vários testes estatísticos, nomeadamente, a análise de resíduos, teste das áreas normalizadas, teste de RIKILT e o teste de Mandel (97,99).

Os critérios de aceitação internos estabelecidos para aceitação dos resultados foram:

- A reta de calibração deve apresentar no mínimo 5 pontos;
- Coeficiente de Determinação ( $R^2$ )  $\geq 0,990$ ;
- Análise de resíduos  $\pm 15\%$ ;
- Valor do teste de RIKILT  $\geq 90\%$  e  $\leq 110\%$ ;
- Teste de Mandel  $VT < F(0,05; 1; L-3)$ ;
- Valor do teste das áreas normalizadas  $\geq 85\%$  e  $\leq 115\%$ .

## 6.2 Determinação Quantitativa de Pesticidas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS

### 6.2.1 Equipamento e Material

#### 6.2.1.1 Equipamento

- Cromatógrafo líquido de ultra resolução UPLC, modelo Vanquish, Thermo Scientific, equipado com:
  - *Software* Xcalibur versão 4.2.47
  - Bomba binária
  - Injetor automático
  - Compartimento termostaticado para a coluna
- Espectrómetro de massa (MS/MS), modelo TSQ Quantis, Thermo Scientific, constituído por:

- Sonda de ionização por *electrospray*
- Analisador do tipo triplo quadrupolo
- Multiplicador de eletrões
- Balança Analítica, modelo XS204, Mettler Toledo
- Agitador Vortex, modelo MS3 digital, IKA
- Sistema de obtenção de água ultra pura, modelo Milli-Q Q-POD®, Millipore
- Sistema de evaporação sob fluxo de azoto, modelo *Turbo Vap II*, Zymark
- Banho Ultra-Sons, VWR
- Sistema de extração de amostras em fase sólida (SPE), modelo Auto Trace 280, Dionex

#### 6.2.1.2 Material

Nesta secção descreve-se o material específico utilizado na aplicação desta metodologia, não sendo referidos materiais de uso corrente de laboratório.

- Coluna cromatográfica, ACQUITY UPLC® HSS T3, 1.8 µm, Waters (2,1mm×100 mm)
- Coluna Cromatográfica, Atlantis™ dC18, 5 µm, Waters (2,1 mm×150 mm)
- Coluna Cromatográfica, Luna® Omega, 1.6 µm, Phenomenex (2,1 mm×100 mm)
- Vials de vidro (volume reduzido), âmbar, com roscas de politetrafluoretileno e septos de silicone, Supelco
- Seringa eletrónica de 100 µL e 500 µL, modelo eVol® XR, SGE Analytical Science
- Cartucho de extração Oasis® HLB, 6 mL, 200 mg, Waters

### 6.2.2 Reagentes

#### 6.2.2.1 Reagentes Gerais

- Água Ultra Pura
- Acetato de Amónia, CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>, *p.a.*, ≥ 98%, Merck
- Acetona, CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, *p.a.*, ≥ 99,9%, Carlo Herba Reagents
- Ácido Fórmico, HCOOH, *p.a.*, ≥ 98%, Carlo Herba Reagents
- Metanol, CH<sub>3</sub>OH, Lichrosolv ®, *p.a.*, ≥ 99,9%, Carlo Herba Reagents

**6.2.2.2 Padrões Primários**

- 2,4-D (ácido diclorofenóxiacético),  $C_8H_6Cl_2O_3$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,3\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Bentazona,  $C_{10}H_{12}N_2O_3S$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,36\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Carbendazima,  $C_9H_9N_3O_2$ , AR, *p.a.*,  $\geq 98,57\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Carbofurão,  $C_{12}H_{15}NO_3$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,53\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Cimoxanil,  $C_7H_{10}N_4O_3$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,6\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Clortolurão,  $C_{10}H_{13}ClN_2O$ , AR, *p.a.*,  $\geq 98,88\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Desetilatrizona,  $C_6H_{10}ClN_5$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,06\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Desetilsimazina,  $C_5H_8ClN_5$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,02\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Desetilterbutilazina,  $C_7H_{12}ClN_5$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,26\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Dimetoato,  $C_5H_{12}NO_3PS_2$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,37\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Dimoxistrobina,  $C_{19}H_{22}N_2O_3$ , Pestanal®, *p.a.*,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich
- Diurão,  $C_9H_{10}Cl_2N_2O$ , AR, *p.a.*,  $\geq 98,7\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Famoxadona,  $C_{22}H_{18}N_2O_4$ , AR, *p.a.*,  $\geq 98,37\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Imazalil,  $C_{14}H_{14}Cl_2N_2O$ , Pestanal®, *p.a.*,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich
- Imidaclopride,  $C_9H_{10}ClN_5O_2$ , AR, *p.a.*,  $\geq 98,55\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Ipconazol,  $C_{18}H_{24}ClN_3O$ , AR, *p.a.*,  $\geq 98,85\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Isoproturão,  $C_{12}H_{18}N_2O$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,1\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Linurão,  $C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$ , AR, *p.a.*,  $\geq 98,64\%$ , Dr. Enrenstorfer
- MCPA (do inglês, *2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid*),  $C_9H_9ClO_3$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,11\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Metconazol,  $C_{17}H_{22}ClN_3O$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,8\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Metidatião,  $C_6H_{11}N_2O_4PS_3$ , AR, *p.a.*,  $\geq 98,32\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Metiocarbe,  $C_{11}H_{15}NO_2S$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,35\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Oxadiazão,  $C_{15}H_{18}Cl_2N_2O_3$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,6\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Oxamil,  $C_7H_{13}N_3O_3S$ , AR, *p.a.*,  $\geq 98,65\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Penconazol,  $C_{13}H_{15}Cl_2N_3$ , Pestanal®, *p.a.*,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich
- Pirimetanil,  $C_{12}H_{13}N_3$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,57\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Prochloraz,  $C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$ , Pestanal®, *p.a.*,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich
- Propanil,  $C_9H_9Cl_2NO$ , AR, *p.a.*,  $\geq 98,64\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Tebuconazol,  $C_{16}H_{22}ClN_3O$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,34\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Tetraconazol,  $C_{13}H_{11}Cl_2F_4N_3O$ , Pestanal®, *p.a.*,  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich

- Triclopir,  $C_7H_4Cl_3NO_3$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,58\%$ , Dr. Enrenstorfer

### 6.2.2.3 Padrões *Surrogate*

- Bentazona D6,  $C_{10}H_6N_2O_3SD_6$ , AR, *p.a.*,  $\geq 99,08\%$ , Dr. Enrenstorfer
- Carbendazima D3,  $C_9H_6N_3O_2D_3$ , Pestanal®, *p.a.*,  $\geq 99,2\%$ , Sigma-Aldrich
- Carbofurão D3,  $C_{12}H_{12}NO_3D_3$ , *p.a.*,  $\geq 99,2\%$ , CDN Isotopes
- Desetilsimazina D5,  $C_5H_3ClN_5D_5$ , AR, *p.a.*,  $\geq 93,2\%$ , Dr. Enrenstorfer
- MCPA D3,  $C_9H_6ClO_3D_3$ , AR, *p.a.*,  $\geq 90,9\%$ , Dr. Enrenstorfer

### 6.2.2.4 Amostras

Neste trabalho, foram analisadas amostras de água de consumo humano e água naturais (subterrâneas e superficiais) de diferentes zonas de abastecimento e captação da EPAL e AdVT.

## 6.2.3 Preparação de Soluções

### 6.2.3.1 Fase Móvel

No decorrer do desenvolvimento dos estudos realizados no equipamento UPLC-ESI-MS/MS foram usadas fases móveis composta por dois solventes, como se pode observar na tabela 6.8.

**Tabela 6.8:** Fases móveis utilizada na análise cromatográfica por UPLC-MS/MS.

Solvente A	Solvente B
Água: Metanol (9:1) + 0,05 mM Acetato de Amónia	Metanol: Água (9:1) + 0,05 mM Acetato de Amónia

Para proceder à preparação do solvente A, dissolveu-se 0,3854g de acetato de amónia em um balão volumétrico de 1000mL contendo água ultra pura. O volume do balão foi aferido com água ultra pura e em seguida levado ao banho de ultra sons, durante 5 minutos, para desgaseificação. Para a preparação do solvente B procedeu-se de forma semelhante, sendo utilizado o metanol ao invés da água ultra pura.

Após a desgaseificação, misturar 100 mL do solvente B com 900 mL do solvente A (eluente A). Misturar 100 mL do solvente A com 900 mL do solvente B (eluente B). Ambas as soluções foram desgaseificadas por mais cinco minutos.

### 6.2.3.2 Soluções Padrão

#### 6.2.3.2.1 Soluções Mãe de Pesticidas

Pesar cerca de 20 mg de cada pesticida para balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com metanol. Estas soluções foram armazenadas em um frigorífico, ao abrigo da luz, a uma temperatura entre 2 a 8 °C.

A tabela 6.9 apresenta a concentração de cada solução mãe, sendo estas corrigidas pela pureza de cada composto.

**Tabela 6.9:** Concentração das soluções mãe de pesticidas para a análise por UPLC-MS/MS.

Pesticida	Massa de Padrão pesada (g)	Pureza ( % )	Volume Final ( mL )	Concentração ( mg/L )
Oxamil	0,0236	98,65	50	466
Bentazona	0,0211	99,36	50	419
Desetilsimazina	0,0210	99,02	50	416
Imidaclopride	0,0207	98,55	50	408
Dimetoato	0,0214	99,37	50	425
Cimoxanil	0,0208	99,60	50	414
Desetilatrizona	0,0218	99,06	50	432
Carbendazima	0,0218	98,57	50	430
MCPA	0,0217	99,11	50	430
2,4-D	0,0218	99,93	50	436
Triclopir	0,0216	99,58	50	430
Carbofurão	0,0210	99,53	50	418
Desetilterbutilazina	0,0217	99,26	50	431
Clortolurão	0,0224	98,88	50	443
Isoproturão	0,0203	99,11	50	402
Diurão	0,0201	98,70	50	397
Metidatião	0,0212	98,32	50	417
Linurão	0,0211	98,64	50	416
Metiocarbe	0,0212	99,35	50	421
Propanil	0,0223	98,64	50	440
Pirimetanil	0,0237	99,57	50	472
Tetraconazole	0,1000	98,00	50	1960
Dimoxistrobina	0,0204	98,00	50	400
Famoxadon	0,0201	98,35	50	395
Tebuconazole	0,0200	99,34	50	397
Penconazole	0,0201	98,00	50	394
Imazalil	0,0203	98,00	50	398
Metconazole	0,0200	99,8	50	399
Procloraz	0,0201	98,00	50	394
Ipconazole	0,0202	98,85	50	399
Oxadiazão	0,0214	99,60	50	426

#### 6.2.3.2.2 Solução Padrão Conjunta de Pesticidas

Transferir o volume adequado de cada uma das soluções mãe de pesticidas (6.2.3.2.1), para um balão volumétrico de 100 mL, e perfazer o volume com metanol.

A tabela 6.10 apresenta a concentração de cada pesticida na solução padrão conjunta.

**Tabela 6.10:** Concentração da solução padrão conjunta de pesticidas para análise por UPLC-MS/MS.

Pesticida	Concentração Solução Mãe (mg/L)	Volume (mL)	Volume Final (mL)	Concentração (mg/L)
Oxamil	466	0,90	100	4,2
Bentazona	419	0,75	100	3,1
Desetilsimazina	416	1,00	100	4,2
Imidaclopride	408	1,03	100	4,2
Dimetoato	425	1,00	100	4,3
Cimoxanil	414	1,00	100	4,1
Desetilatrizona	432	0,97	100	4,2
Carbendazima	430	0,98	100	4,2
MCPA	430	0,98	100	4,2
2,4-D	436	0,96	100	4,2
Triclopir	430	0,98	100	4,2
Carbofurão	418	1,00	100	4,2
Desetilterbutilazina	431	0,97	100	4,2
Clortolurão	443	0,95	100	4,2
Isoproturão	402	1,04	100	4,2
Diurão	397	1,06	100	4,2
Metidatião	417	1,00	100	4,2
Linurão	416	1,00	100	4,2
Metiocarbe	421	1,00	100	4,2
Propanil	440	0,95	100	4,2
Pirimetanil	472	0,89	100	4,2
Tetraconazole	1960	0,21	100	4,1
Dimoxistrobina	400	1,05	100	4,2
Famoxadona	395	1,06	100	4,2
Tebuconazole	397	1,06	100	4,2
Penconazole	394	1,07	100	4,2
Imazalil	398	1,06	100	4,2
Metconazole	399	1,05	100	4,2
Procloraz	394	1,07	100	4,2
Ipconazole	399	1,05	100	4,2
Oxadiazão	426	0,98	100	4,2

#### 6.2.3.2.3 Soluções Mãe dos “*Surrogate*”

As soluções mãe da maioria dos padrões “*surrogate*” foram preparadas por diluição, em metanol, de 10 mg do composto em um balão volumétrico de 25 mL. No caso da preparação do carbofurão D3, pesou-se cerca de 20 mg do composto, sendo este transferido para um balão volumétrico de 50 mL e dissolvido em metanol. Os balões foram aferidos e armazenado entre 2 a 8 °C ao abrigo da luz.

A tabela 6.11 apresenta a concentração de cada solução mãe, sendo estas corrigidas pela pureza de cada composto.

**Tabela 6.11:** Concentração das soluções mãe dos “surrogate”.

Pesticida	Massa de Padrão pesada (g)	Pureza (%)	Volume Final ( mL )	Concentração ( mg/L )
Bentazona D5	0,0100	99,08	25	396
Desetilsimazina D6	0,0100	93,20	25	373
MCPA D3	0,0100	90,90	25	364
Carbofurão D3	0,0203	99,20	50	403
Carbendazima D3	0,0100	99,90	25	400

**6.2.3.2.4 Solução Padrão Conjunta dos “Surrogate”**

A solução padrão conjunta dos “surrogate”, foi preparada transferindo, com uma pipeta volumétrica, as quantidades indicadas na tabela 6.12 de cada solução mãe, para um balão volumétrico de 25 mL, perfazendo o volume com metanol.

**Tabela 6.12:** Concentração da solução padrão conjunta dos “surrogate”.

Pesticida	Concentração Solução Mãe (mg/L)	Volume ( mL )	Volume Final ( mL )	Concentração ( mg/L )
Bentazona D5	396	0,510	25	8,1
Desetilsimazina D6	373	0,715		10,7
MCPA D3	364	0,730		10,6
Carbofurão D3	403	0,660		10,6
Carbendazima D3	400	0,665		10,6

**6.2.3.2.5 Solução Padrão Intermédia dos “Surrogate”**

Para a preparação da solução padrão intermédia foi transferido, com a ajuda de uma seringa eletrônica, 142  $\mu$ L da solução padrão conjunta dos “surrogate” (6.2.3.2.3), para um balão volumétrico de 5 mL. A solução foi diluída numa mistura de água/metanol + 5 mM de acetato de amónio (9:1).

A tabela 6.13 apresenta a concentração de cada padrão interno na solução intermédia de “surrogate”.

**Tabela 6.13:** Concentração da solução padrão intermédia dos “surrogate”.

Pesticida	Concentração Solução Intermédia (mg/L)	Volume ( $\mu$ L )	Volume Final ( mL )	Concentração ( $\mu$ g/L )
Bentazona D5	8,1	142	5	229,6
Desetilsimazina D6	10,7			302,8
MCPA D3	10,6			301,5
Carbofurão D3	10,6			302,0
Carbendazima D3	10,6			301,9

### **6.2.3.3 Soluções para a Otimização das Condições de Operação do Espectrómetro de Massa**

#### **6.2.3.3.1 Soluções Padrão Individuais para Infusões**

Para cada pesticida e “*surrogate*”, foi preparada uma solução padrão individual para infusão, com uma concentração próxima a 1 mg/L, a partir das soluções mãe (6.2.3.2.1), utilizando o metanol como solvente de diluição.

#### **6.2.3.4 Soluções Padrão para Validação da Gama de Trabalho**

##### **6.2.3.4.1 Solução Padrão Intermédia para Estudo da Linearidade**

Diluir 100 µL da solução conjunta de pesticidas (6.2.3.2.2), para um balão volumétrico de 10 mL, e perfazer o volume com a solução de água/metanol + 5 mM de acetato de amónio (9:1).

A tabela 6.14 apresenta a concentração de cada pesticida na solução padrão intermédia usada nos estudos de validação.



**Tabela 6.14:** Concentração de cada pesticida na solução padrão intermédia para estudo da linearidade.

Pesticida	Concentração Solução Conjunta (mg/L)	Volume ( µL )	Volume Final ( mL )	Concentração ( µg/L )
Oxamil	4,19	100	10	41,9
Bentazona	3,14		10	31,4
Desetilsimazina	4,16		10	41,6
Imidaclopride	4,20		10	42,0
Dimetoato	4,25		10	42,5
Cimoxanil	4,14		10	41,4
Desetilatrastina	4,19		10	41,9
Carbendazima	4,21		10	42,1
MCPA	4,22		10	42,2
2,4-D	4,18		10	41,8
Triclopir	4,22		10	42,2
Carbofurão	4,18		10	41,8
Desetilterbutilazina	4,18		10	41,8
Clortolurão	4,21		10	42,1
Isoproturão	4,18		10	41,8
Diurão	4,21		10	42,1
Metidatião	4,17		10	41,7
Linurão	4,16		10	41,6
Metiocarbe	4,21		10	42,1
Propanil	4,18		10	41,8
Pirimetanil	4,20		10	42,0
Tetraconazole	4,12		10	41,2
Dimoxistrobina	4,20		10	42,0
Famoxadona	4,19		10	41,9
Tebuconazole	4,21		10	42,1
Penconazole	4,22		10	42,2
Imazalil	4,22		10	42,2
Metconazole	4,19		10	41,9
Procloraz	4,22		10	42,2
Ipconazole	4,19		10	41,9
Oxadiazão	4,18		10	41,8

#### 6.2.3.4.2 Soluções Padrão de Trabalho para Estudo da Linearidade

As soluções padrão de trabalho para os pesticidas usadas para a validação do método analítico foram preparadas por diluição da solução padrão intermédia, com uma mistura de água/metanol + 5 mM de acetato de amónio (9:1). Foram preparadas 7 soluções padrão de trabalho para a validação, como se pode observar na tabela 6.15.

**Tabela 6.15:** Concentração de cada pesticida nos padrões da curva de calibração.

Pesticida	Concentração Solução Intermédia (µg/L)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Oxamil	41,9	2,5	5,0	7,5	10,1	15,1	20,1	25,1
Bentazona	31,4	1,9	3,8	5,7	7,5	11,3	15,1	18,9
Desetilsimazina	41,6	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0	20,0	25,0
Imidaclopride	42,0	2,5	5,0	7,6	10,1	15,1	20,2	25,2
Dimetoato	42,5	2,6	5,1	7,7	10,2	15,3	20,4	25,5
Cimoxanil	41,4	2,5	5,0	7,5	9,9	14,9	19,9	24,9
Desetilatrazina	41,9	2,5	5,0	7,5	10,1	15,1	20,1	25,1
Carbendazima	42,1	2,5	5,1	7,6	10,1	15,2	20,2	25,3
MCPA	42,2	2,5	5,1	7,6	10,1	15,2	20,2	25,3
2,4-D	41,8	2,5	5,0	7,5	10,0	15,1	20,1	25,1
Triclopir	42,2	2,5	5,1	7,6	10,1	15,2	20,2	25,3
Carbofurão	41,8	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0	20,1	25,1
Desetilterbutilazina	41,8	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0	20,1	25,1
Clortolurão	42,1	2,5	5,0	7,6	10,1	15,1	20,2	25,2
Isoproturão	41,8	2,5	5,0	7,5	10,0	15,1	20,1	25,1
Diurão	42,1	2,5	5,0	7,6	10,1	15,1	20,2	25,2
Metidatião	41,7	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0	20,0	25,0
Linurão	41,6	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0	20,0	25,0
Metiocarbe	42,1	2,5	5,1	7,6	10,1	15,2	20,2	25,3
Propanil	41,8	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0	20,1	25,1
Pirimetanil	42,0	2,5	5,0	7,6	10,1	15,1	20,2	25,2
Tetraconazole	41,2	2,5	4,9	7,4	9,9	14,8	19,8	24,7
Dimoxistrobina	42,0	2,5	5,0	7,6	10,1	15,1	20,2	25,2
Famoxadona	41,9	2,5	5,0	7,5	10,1	15,1	20,1	25,2
Tebuconazole	42,1	2,5	5,1	7,6	10,1	15,2	20,2	25,3
Penconazole	42,2	2,5	5,1	7,6	10,1	15,2	20,2	25,3
Imazalil	42,2	2,5	5,1	7,6	10,1	15,2	20,2	25,3
Metconazole	41,9	2,5	5,0	7,5	10,1	15,1	20,1	25,1
Procloraz	42,2	2,5	5,1	7,6	10,1	15,2	20,2	25,3
Ipconazole	41,9	2,5	5,0	7,5	10,1	15,1	20,1	25,2
Oxadiazão	41,8	2,5	5,0	7,5	10,0	15,0	20,1	25,1

**Nota:**

**P1** – Misturar 30 µL da solução padrão intermédia + 20 µL da solução padrão intermédia dos “surrogate” + 450 µL do solvente;

**P2** – Misturar 60 µL da solução padrão intermédia + 20 µL da solução padrão intermédia dos “surrogate” + 420 µL do solvente;

**P3** – Misturar 90 µL da solução padrão intermédia + 20 µL da solução padrão intermédia dos “surrogate” + 390 µL do solvente;

**P4** – Misturar 120 µL da solução padrão intermédia + 20 µL da solução padrão intermédia dos “surrogate” + 360 µL do solvente;

**P5** – Misturar 180 µL da solução padrão intermédia + 20 µL da solução padrão intermédia dos “surrogate” + 300 µL do solvente;

**P6** – Misturar 240 µL da solução padrão intermédia + 20 µL da solução padrão intermédia dos “surrogate” + 240 µL do solvente;

**P7** – Misturar 300 µL da solução padrão intermédia + 20 µL da solução padrão intermédia dos “surrogate” + 180 µL do solvente.

### 6.2.3.5 Soluções Padrão para o Estudo da Precisão

A partir da solução padrão intermédia para estudo da linearidade, prepararam-se várias soluções com concentrações correspondentes aos limites inferiores (P1) e superiores (P7) da gama de trabalho para cada um dos pesticidas. Foi preparado também uma solução com concentração correspondente ao ponto intermédio (PIntermédio) da curva de calibração. Para isto foram pipetados 146 µL da solução padrão intermédia (6.2.3.4.1) e 20 µL da solução padrão intermédia dos “surrogate” (6.2.3.2.4) para 334 µL do solvente. A concentração do ponto intermédio para cada pesticida pode ser observada na tabela 6.16.

**Tabela 6.16:** Concentração do ponto intermédio de cada pesticida para estudo da precisão.

Pesticida	PIntermédio (µg/L)	Pesticida	PIntermédio (µg/L)
Oxamil	12,3	Metidatião	12,3
Bentazona	9,1	Linurão	12,3
Desetilsimazina	12,2	Metiocarbe	12,3
Imidaclopride	12,3	Propanil	12,3
Dimetoato	12,3	Pirimetanil	11,8
Cimoxanil	11,9	Tetraconazole	12,0
Desetilatrastina	12,2	Dimoxistrobina	12,3
Carbendazima	12,0	Famoxadona	12,2
MCPA	12,4	Tebuconazole	12,3
2,4-D	12,2	Penconazole	12,3
Triclopir	12,3	Imazalil	12,3
Carbofurão	12,2	Metconazole	12,2
Desetilterbutilazina	12,4	Procloraz	12,3
Clortolurão	12,2	Ipconazole	12,2
Isoproturão	12,3	Oxadiazão	12,3
Diurão	12,3		

### 6.2.3.6 Soluções Padrão de Pesticidas para Fortificação

#### 6.2.3.6.1 Solução para a Determinação do LOQ

A solução padrão conjunta de fortificação foi preparada pipetando as quantidades necessárias das soluções mãe de pesticidas (6.2.3.2.1), para um balão volumétrico de 100 mL, e diluídas em metanol. A tabela 6.17 apresenta a concentração de cada pesticida na solução padrão conjunta de fortificação.

**Tabela 6.17:** Concentração de cada pesticida na solução padrão de fortificação ao LOQ.

Pesticida	Concentração Solução Mãe (mg/L)	Volume ( mL )	Volume Final ( mL )	Concentração ( mg/L )
Oxamil	466	0,65	100	3,03
Bentazona	419	0,72	100	3,02
Desetilsimazina	416	0,73	100	3,04
Imidaclopride	408	0,74	100	3,02
Dimetoato	425	0,70	100	2,98
Cimoxanil	414	0,73	100	3,02
Desetilatrastina	432	0,70	100	3,02
Carbendazima	430	0,70	100	3,01
MCPA	430	0,70	100	3,01
2,4-D	436	0,69	100	3,01
Triclopir	430	0,70	100	3,01
Carbofurão	418	0,72	100	3,01
Desetilterbutilazina	431	0,70	100	3,02
Clortolurão	443	0,68	100	3,01
Isoproturão	402	0,75	100	3,02
Diurão	397	0,76	100	3,02
Metidatão	417	0,72	100	3,00
Linurão	416	0,72	100	3,00
Metiocarbe	421	0,72	100	3,03
Propanil	440	0,68	100	2,99
Pirimetanil	472	0,64	100	3,02
Tetraconazole	1960	0,15	100	2,94
Dimoxistrobina	400	0,75	100	3,00
Famoxadona	395	0,63	100	2,49
Tebuconazole	397	0,76	100	3,02
Penconazole	394	0,77	100	3,03
Imazalil	398	0,76	100	3,02
Metconazole	399	0,76	100	3,03
Procloraz	394	0,76	100	2,99
Ipconazole	399	0,75	100	3,00
Oxadiazão	426	0,71	100	3,03

#### 6.2.3.6.2 Solução Padrão Intermédia para Determinação do LOQ

A solução padrão intermédia de fortificação foi preparada pipetando 100  $\mu\text{L}$  da solução padrão conjunta de fortificação ao LOQ, para um balão volumétrico de 10 mL, e diluída numa mistura água/metanol + 5 mM de acetato de amónio (9:1), apresentando uma concentração aproximada de 30  $\mu\text{g/L}$  para cada pesticida, exceto a famoxadona, apresentando esta uma concentração de aproximadamente 25  $\mu\text{g/L}$ .

#### 6.2.3.7 Solução para o Estudo do Efeito da Matriz

A solução para o estudo do efeito da matriz foi preparada pela diluição de 377  $\mu\text{L}$  da solução padrão conjunta de fortificação ao LOQ, descrita em 6.2.3.6.1, numa mistura água/metanol + 5 mM de acetato de amónio (9:1) em um balão volumétrico de 10 mL.

### 6.2.4 Método Analítico SPE-UPLC- ESI-MS/MS

O desenvolvimento de um método de LC-MS/MS envolve várias etapas de otimização, nomeadamente as condições cromatográficas, do espectrómetro de massa e, sempre que necessário, os parâmetros relacionados com a preparação da amostra. Tendo a EPAL um método já implementado e acreditado para a análise de um conjunto de pesticidas por LC-MS/MS, foram realizados apenas alguns ajustes nas condições do cromatógrafo e do espectrómetro de massa, de maneira a obter a melhor resposta e sensibilidade para os respetivos pesticidas.

#### 6.2.4.1 Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa

Os parâmetros otimizados nessa etapa foram a obtenção do ião precursor de cada pesticida resultante da ionização do analito, a obtenção dos iões produto resultantes da fragmentação do ião precursor, a voltagem das lentes e a energia de colisão, respetivamente.

A tabela 6.18, apresenta os parâmetros definidos pelo equipamento para o processo de otimização do espectrómetro de massa.

**Tabela 6.18:** Condições definidas para o espectrómetro de massa.

Fluxo	20 µL/min
<b>Fonte de Ionização</b>	<b><i>Electrospray (ESI)</i></b>
Voltagem do <i>Spray</i> para ionização positiva ( <i>ESI+</i> )	3500 V
<b>Voltagem do <i>Spray</i> para ionização negativa (<i>ESI-</i>)</b>	<b>2500 V</b>
Temperatura do Capilar	275 °C
<b>Temperatura de Vaporização</b>	<b>75 °C</b>
Gás <i>Sheath</i>	25 Arb
<b>Gás Auxiliar</b>	<b>5 Arb</b>
Gás <i>Sweep</i>	0 Arb

A otimização das condições de formação do ião precursor de cada pesticida, obtida através da ionização dos compostos por *electrospray* em modo positivo ou negativo, foram realizadas através da infusão de cada solução padrão individual para infusão, descritas em 6.2.3.3.1, através de uma seringa externa de fluxo contínuo.

Numa primeira fase a solução é injetada em modo de aquisição *full scan* para o primeiro quadrupolo, de forma a verificar todos os possíveis iões precursores para cada composto. Este estudo permitiu a determinação ótima de voltagem das lentes para cada pesticida.

A fase seguinte consiste na escolha dos iões produto a partir do ião precursor escolhido para cada analito (modo de aquisição *product ion scan*). Assim, fez-se a programação do primeiro

quadrupolo em modo SIM, permitindo apenas a passagem do ião precursor escolhido, enquanto o terceiro quadrupolo operava em modo *full scan*. Esta fase de otimização permitiu a obtenção dos iões produtos de maiores intensidades e da energia de colisão ótima para cada ião.

Após otimizados os parâmetros operacionais de obtenção do ião precursor e dos respectivos iões produto, estão reunidas as condições para definir as duas transições para cada analito em estudo. A primeira transição (MRM1) é utilizada na quantificação e a segunda (MRM2) é usada na qualificação de cada composto.

#### 6.2.4.2 Condições Cromatográficas

A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna Atlantis™ dC18 (5 µm; 2,1mm x 100mm), utilizando como fase móvel um gradiente dos solventes A e B, descritos em 6.2.3.1. A figura 6.1 apresenta o gradiente de fase móvel utilizado.

No	Time	Flow [ml/min]	%B	Curve
1	0.000	Run		
2	0.000	0.300	0.0	5
3	0.200	0.300	0.0	5
4	7.000	0.300	100.0	5
5	12.000	0.300	100.0	5
6	12.010	0.300	0.0	5
7	17.000	0.300	0.0	5
8	New Row			
9	17.000	Stop Run		

**Figura 6.1:** Gradiente da fase móvel.

Na tabela 6.19, encontram-se apresentadas as condições cromatográficas utilizadas no método.

**Tabela 6.19:** Condições cromatográficas

Volume de Injeção	20 µL
Fluxo do Eluente	0,3 mL/min
Tempo de Análise	17 min
Temperatura da Coluna	30 °C

#### 6.2.4.3 Condições do Espectrómetro de Massa

##### 6.2.4.3.1 Condições do Método Instrumental

Através da otimização são obtidos os dados necessários para definir o método de análise dos pesticidas no *software* do equipamento. As voltagens das lentes, bem como os iões precursor e

produto referentes às transições de quantificação (MRM1) e de qualificação (MRM2) e as respectivas energias de colisão são apresentadas na tabela 6.20.

**Tabela 6.20:** Método criado no software do equipamento para análise dos compostos por UPLC-ESI-MS/MS.

Pesticida	Janela de retenção (min)	Polaridade	Voltagem das Lentes (V)	Transição MRM		Energia de Colisão (V)
				Ião Precursor - Ião Produto		
Oxamil	3,96 - 5,96	+	60	MRM 1	237,1 → 71,9	14
				MRM 2	237,1 → 89,9	9
<b>Bentazona</b>	<b>4,74 - 6,74</b>	<b>-</b>	<b>130</b>	<b>MRM 1</b>	<b>239,1 → 132,0</b>	<b>25</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>239,1 → 196,9</b>	<b>19</b>
Bentazona D6	4,74 - 6,74	-	150	MRM	245,0 → 131,9	27
<b>Desetilsimazina</b>	<b>5,0 - 7,0</b>	+	<b>115</b>	<b>MRM 1</b>	<b>174,1 → 103,9</b>	<b>24</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>174,1 → 131,9</b>	<b>18</b>
Desetilsimazina D5	5,0 - 7,0	+	115	MRM	179,2 → 100,9	18
<b>Imidaclopride</b>	<b>5,02 - 7,02</b>	+	<b>100</b>	<b>MRM 1</b>	<b>256,1 → 209,0</b>	<b>19</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>256,1 → 175,0</b>	<b>16</b>
Dimetoato	5,46 - 7,46	+	90	MRM 1	230,1 → 198,8	22
				MRM 2	230,1 → 124,8	10
<b>Cimoxanil</b>	<b>5,77 - 7,77</b>	+	<b>80</b>	<b>MRM 1</b>	<b>199,1 → 127,9</b>	<b>19</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>199,1 → 110,9</b>	<b>9</b>
Desetilatrazina	5,85 - 7,85	+	110	MRM 1	188,1 → 145,9	26
				MRM 2	188,1 → 103,9	18
<b>Carbendazima</b>	<b>5,97 - 7,97</b>	+	<b>125</b>	<b>MRM 1</b>	<b>192,1 → 159,9</b>	<b>31</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>192,1 → 131,9</b>	<b>18</b>
Carbendazima D3	5,97 - 7,97	+	80	MRM	195,1 → 159,9	17
<b>MCPA</b>	<b>6,26 - 8,26</b>	<b>-</b>	<b>80</b>	<b>MRM 1</b>	<b>199,0 → 140,9</b>	<b>13</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>201,0 → 142,9</b>	<b>13</b>
MCPA D3	6,26 - 8,26	-	90	MRM	202,2 → 143,9	14
<b>2,4 – D</b>	<b>6,26 - 8,26</b>	<b>-</b>	<b>70</b>	<b>MRM 1</b>	<b>219,0 → 160,9</b>	<b>12</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>221,0 → 162,9</b>	<b>12</b>
Triclopir	6,58 - 8,58	-	65	MRM 1	254,0 → 195,8	10
				MRM 2	256,0 → 197,8	10
<b>Carbofurão</b>	<b>6,64 - 8,54</b>	+	<b>110</b>	<b>MRM 1</b>	<b>222,2 → 165,0</b>	<b>22</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>222,2 → 122,9</b>	<b>13</b>
Carbofurão D3	6,64 - 8,54	+	75	MRM	225,2 → 165,0	12
<b>Desetilterbutilazina</b>	<b>6,88 - 8,88</b>	+	<b>100</b>	<b>MRM 1</b>	<b>202,1 → 145,9</b>	<b>16</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>204,1 → 147,9</b>	<b>17</b>
Clortolurão	7,2 - 9,2	+	120	MRM 1	213,0 → 71,9	17
				MRM 2	213,0 → 45,9	19
<b>Isoproturão</b>	<b>7,35 - 9,35</b>	+	<b>140</b>	<b>MRM 1</b>	<b>207,2 → 71,9</b>	<b>19</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>207,2 → 165,0</b>	<b>15</b>
Diurão	7,47 - 9,47	+	150	MRM 1	233,0 → 71,9	18
				MRM 2	233,0 → 45,9	20
<b>Metidatião</b>	<b>7,54 - 9,54</b>	+	<b>100</b>	<b>MRM 1</b>	<b>303,0 → 144,9</b>	<b>21</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>303,0 → 84,9</b>	<b>10</b>
Linurão	7,82 - 9,82	+	130	MRM 1	249,1 → 181,9	19
				MRM 2	249,1 → 159,9	16
<b>Metiocarbe</b>	<b>7,83 - 9,83</b>	+	<b>100</b>	<b>MRM 1</b>	<b>226,1 → 169,0</b>	<b>20</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>226,1 → 121,0</b>	<b>10</b>
Propanil	7,88 - 9,88	+	115	MRM 1	218,0 → 161,9	27
				MRM 2	218,0 → 126,9	16

**Tabela 6.20 (continuação):** Método criado no software do equipamento para análise dos compostos por UPLC-ESI-MS/MS.

Pesticida	Janela de retenção (min)	Polaridade	Voltagem das Lentes (V)	Transição MRM		Energia de Colisão (V)
				Ião Precursor - Ião Produto		
<b>Pirimetanil</b>	<b>7,89 - 9,89</b>	+	<b>170</b>	<b>MRM 1</b>	<b>200,2 → 106,9</b>	<b>27</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>200,2 → 82,9</b>	<b>25</b>
Tetraconazol	8,11 - 10,11	+	170	MRM 1	372,2 → 158,9	23
				MRM 2	372,2 → 69,9	30
<b>Dimoxistrobina</b>	<b>8,45 - 10,45</b>	+	<b>95</b>	<b>MRM 1</b>	<b>327,3 → 205,0</b>	<b>22</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>327,3 → 115,9</b>	<b>10</b>
Famoxadona	8,52 - 10,52	+	115	MRM 1	392,2 → 331,1	18
				MRM 2	392,2 → 238,0	10
<b>Tebuconazol</b>	<b>8,54 - 10,54</b>	+	<b>170</b>	<b>MRM 1</b>	<b>308,2 → 69,9</b>	<b>23</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>308,2 → 124,9</b>	<b>41</b>
Penconazol	8,55 - 10,55	+	130	MRM 1	284,1 → 69,9	18
				MRM 2	284,1 → 158,8	29
<b>Imazalil</b>	<b>8,62 - 10,62</b>	+	<b>160</b>	<b>MRM 1</b>	<b>297,2 → 158,9</b>	<b>23</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>297,2 → 254,9</b>	<b>18</b>
Metconazol	8,74 - 10,74	+	156	MRM 1	320,2 → 69,9	24
				MRM 2	320,2 → 124,9	38
<b>Procloraz</b>	<b>8,79 - 10,79</b>	+	<b>105</b>	<b>MRM 1</b>	<b>376,2 → 307,9</b>	<b>18</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>376,2 → 265,9</b>	<b>12</b>
Ipconazol	9,12 - 11,12	+	140	MRM 1	334,3 → 69,9	23
				MRM 2	334,3 → 124,9	39
<b>Oxadiazão</b>	<b>9,53 - 11,53</b>	+	<b>150</b>	<b>MRM 1</b>	<b>345,2 → 302,9</b>	<b>20</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>345,2 → 219,8</b>	<b>13</b>

#### 6.2.4.3.2 Condições de Operação da *Tune*

Na *tune* foram programadas as condições referentes à fonte de ionização em *electrospray*, e ao analisador de massa. Os valores utilizados tiveram como base os valores *standard* do equipamento, que se encontram apresentados na figura 6.2.



TSQ Quantis Tune Application 3.2.2625.33

ION SOURCE	DEFINE SCAN	CALIBRATION	OPTIMIZATION	SRM Properties
Current LC Flow (μL/min)		0.3		Polarity
		<input type="button" value="Get Defaults"/>		Defined in Table
Ion Source Type		Heated ESI		Use Cycle Time
Pos Ion Spray Voltage ( V )		3500	3426.5	<input checked="" type="checkbox"/>
Neg Ion Spray Voltage ( V )		2500		Cycle Time (sec)
				0.8
<input checked="" type="checkbox"/> Sheath Gas (Arb)	55	55.0		Use Calibrated RF Lens
<input checked="" type="checkbox"/> Aux Gas (Arb)	10	10.0		<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/> Sweep Gas (Arb)	1	1.0		Q1 Resolution (FWHM)
<input checked="" type="checkbox"/> Ion Transfer Tube Temp (°C)	325	325.0		0.7
<input checked="" type="checkbox"/> Vaporizer Temp (°C)	350	350.3		Q3 Resolution (FWHM)
				1.2
				CID Gas (mTorr)
				1.5
				Source Fragmentation
				0
				Chromatographic Peak Width (sec)
				10
				Use Chromatographic Filter
				<input checked="" type="checkbox"/>
				Use Retention Time Reference
				<input type="checkbox"/>
				Display Retention Time
				<input checked="" type="checkbox"/>
				Use Quan Ion
				<input type="checkbox"/>

**Figura 6.2:** Condições da *tune* da fonte de ionização e do analisador de massa.

#### 6.2.4.4 Preparação da Amostra (SPE)

A preparação das amostras foi realizada tendo por base a metodologia de extração em fase sólida (método interno da EPAL) num sistema de SPE automatizado, utilizando o cartucho de extração OASIS HLB (6 mL, 200 mg). As condições pré-definidas do método utilizadas pelo programa de extração estão apresentadas na tabela 6.21.

**Tabela 6.21:** Condições utilizadas pelo programa de extração por SPE para análise de pesticidas.

<b>Ativação do Cartucho</b>	6 mL de metanol/acetona (3:2) + 5 mL de metanol + 5 mL de água ultra pura a 10 mL/min
<b>Passagem da Amostra</b>	125 mL de amostra a 30 mL/min + 20 μL da solução padrão intermédia dos “surrogate”
<b>Lavagem do Cartucho</b>	1 mL de água ultra pura a 10 mL/min
<b>Secagem do Cartucho</b>	10 minutos com corrente de azoto
<b>Eluição</b>	4 mL + 2 mL de metanol/acetona (3:2) a 2 mL/min

O extrato final foi concentrado em um sistema de evaporação com corrente de azoto (*Turbovap*), a 0,3 bar e uma temperatura do banho de água de aproximadamente 35 °C, até cerca de 0,2 mL (não deixar ir à secura). O volume foi ajustado a 0,5 mL com uma solução mistura

água/metanol + 5 mM de acetato de amónio (9:1), e transferido para um vial para posterior análise cromatográfica.

### **6.2.5 Validação do Método Analítico UPLC-ESI- MS/MS**

#### **6.2.5.1 Testes de Linearidade**

Para proceder a validação do método cromatográfico, iniciou-se os testes de linearidade para os pesticidas por injeção das soluções padrão de trabalho para validação, descritas em 6.2.3.4.2. Realizou-se também o teste de linearidade para os padrões “*surrogate*” por injeção das soluções padrão de trabalho para validação dos “*surrogate*”, descrita em 6.2.3.4.4.

Os resultados obtidos foram tratados através de uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, de acordo com a norma ISO 8466-1, obtendo-se uma reta de calibração (área *vs* concentração). Os testes estatísticos aplicados e os critérios de aceitação internos estabelecidos para aceitação dos resultados foram os descritos no ponto 6.1.5.

#### **6.2.5.2 Precisão em Condições de Repetibilidade**

A precisão instrumental foi estudada em condições de repetibilidade (n=10), baseando-se na análise da resposta do equipamento face a injeção das soluções padrão para o estudo da precisão, descritas em 6.2.3.5.

#### **6.2.5.3 Precisão Intermédia**

A precisão intermédia foi avaliada em diferentes dias de análise, por injeção das soluções padrão para o estudo da precisão, pormenorizada em 6.2.3.5.

#### **6.2.5.4 Limiares Analíticos Instrumentais**

Os limites de deteção e quantificação instrumentais foram calculados através de três metodologias:

1. Avaliação estatística de uma calibração linear (ou não linear);
2. Avaliação do nível de ruído em sistemas cromatográficos (razão sinal-ruído);

### 3. Análise de brancos de matriz fortificados.

Para a segunda e a terceira metodologia, os cálculos dos limiares analíticos foram realizados após várias leituras ( $n=10$ ) do padrão mais baixo da gama de trabalho (P1), a fim de se obter o valor do desvio padrão e a média da razão sinal-ruído.

## 6.2.6 Validação do Método Analítico SPE-UPLC-ESI- MS/MS

### 6.2.6.1 Efeito da Matriz

O efeito da matriz deve ser avaliado durante o processo de validação do método cromatográfico e de preparação da amostra. Neste trabalho foram realizados três estudos distintos para analisar a influência do efeito da matriz nos diferentes tipos de matriz estudada.

#### 6.2.6.1.1 Precisão dos Ensaios de Recuperação em Diferentes Matrizes

Para o estudo da precisão dos ensaios de recuperação em diferentes matrizes, realizou-se a extração de três tipos de águas (consumo humano, superficial e subterrânea) através do método de extração da amostra, descrito em 6.2.4.4, fortificadas com 0,5 ml da solução padrão intermédia de fortificação ao LOQ, descrita em 6.2.3.6.2, e 80  $\mu$ L da solução padrão intermédia dos “*surrogate*”, descrita em 6.2.3.2.4. Foram realizados seis ensaios para cada tipo de água, e determinou-se a percentagem de recuperação. Calcula-se o valor médio da recuperação e o respetivo coeficiente de variação (CV%) para as diferentes matrizes.

#### 6.2.6.1.2 Efeito da Matriz em diferentes níveis de concentração

Para avaliar o efeito da matriz em diferentes níveis de concentração, realizou-se a extração de três tipos de águas (consumo humano, superficial e subterrânea) através do método de extração da amostra, descrito em 6.2.4.4, fortificadas a 0,5 ml, 1,0 mL e 1,5 ml da solução padrão intermédia de fortificação ao LOQ, descrita em 6.2.3.6.2, e 80  $\mu$ L da solução padrão intermédia dos “*surrogate*”, descrita em 6.2.3.2.4. Foram realizados quatro ensaios para cada tipo de água e para cada nível de concentração, determinando-se a percentagem de recuperação. Calcula-se o valor médio da recuperação e o respetivo coeficiente de variação (CV%) para as diferentes matrizes.

O primeiro nível de fortificação corresponde ao LOQ definido pelo Decreto-Lei nº 152/2017 para cada pesticida individual, corrigido com o critério de aceitação ( $\text{LOQ} \leq 30\%$  do valor paramétrico  $< > \text{LOQ} \leq 0,1 \mu\text{g/L} \times 0,30$ ) e com o fator de concentração do método ( $\text{FC} = 250$ ).

A tabela 6.22 apresenta os diferentes níveis de concentração para cada pesticida.

**Tabela 6.22:** Níveis de concentração para o estudo do efeito da matriz.

	0,5 mL (LOQ)	1,0 mL (2×LOQ)	1,5 mL (3×LOQ)
Pesticida	Concentração Teórica 1 ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração Teórica 2 ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração Teórica 3 ( $\mu\text{g/L}$ )
Oxamil	7,6	15,1	22,7
Bentazona	7,5	15,1	22,6
Desetilsimazina	7,6	15,2	22,8
Imidaclopride	7,5	15,1	22,6
Dimetoato	7,4	14,9	22,3
Cimoxanil	7,6	15,1	22,7
Desetilatrastina	7,6	15,1	22,7
Carbendazima	7,5	15,0	22,6
MCPA	7,5	15,1	22,6
2,4-D	7,5	15,0	22,5
Triclopir	7,5	15,1	22,6
Carbofurão	7,5	15,0	22,6
Desetilterbutilazina	7,5	15,1	22,6
Clortolurão	7,5	15,1	22,6
Isoproturão	7,5	15,1	22,6
Diurão	7,5	15,1	22,6
Metidatião	7,5	15,0	22,5
Linurão	7,5	15,0	22,5
Metiocarbe	7,6	15,2	22,7
Propanil	7,5	15,0	22,4
Pirimetanil	7,6	15,1	22,7
Tetraconazole	7,4	14,7	22,1
Dimoxistrobina	7,5	15,0	22,5
Famoxadona	6,3	12,5	18,8
Tebuconazole	7,5	15,1	22,6
Penconazole	7,6	15,2	22,8
Imazalil	7,6	15,1	22,7
Metconazole	7,6	15,2	22,8
Procloraz	7,5	15,0	22,5
Ipconazole	7,5	15,0	22,5
Oxadiazão	7,6	15,1	22,7

#### 6.2.6.1.3 Efeito da Matriz na Fonte de Ionização

Para avaliar o efeito da matriz na fonte de ionização, realizou-se a extração de quatro tipos de águas (ultra-pura, consumo humano, superficial e subterrânea), através do método de extração da amostra, descrito em 6.2.4.4. Após a obtenção dos extratos, preparou-se para cada amostra um padrão contendo 400  $\mu\text{L}$  do extrato da amostra e 20  $\mu\text{L}$  da solução para estudo do efeito da matriz, descrita em 6.2.3.7. Foram realizados dois ensaios para cada tipo de água, e determinou-se a percentagem de recuperação. De seguida calculou-se o valor médio dos resultados (CV%) nas diferentes matrizes.

#### 6.2.6.1.4 Estudos de Recuperação Absoluta

Para os ensaios de recuperação absoluta (sem a adição do padrão “*surrogate*”), adicionou-se 0,5 mL da solução padrão intermédia de fortificação ao LOQ, descrita em 6.2.3.6.2, a 500 mL da matriz a analisar e procedeu-se ao ensaio como descrito em 6.2.4.4. Neste estudo não houve a adição da solução padrão intermédia dos “*surrogate*”.

#### 6.2.6.1.5 Estudos de Recuperação Relativa

Para os ensaios de recuperação relativa (com a adição do padrão “*surrogate*”), adicionou-se 0,5 mL da solução padrão intermédia de fortificação ao LOQ, descrita em 6.2.3.6.2, e 80 µL da solução padrão intermédia dos “*surrogate*”, descrita em 6.2.3.2.4 a 500 mL da matriz a analisar e procedeu-se ao ensaio como descrito em 6.2.4.4.

### 6.2.7 Limiares Analíticos do Método Global

Após os estudos de recuperação, foi estimado o limite de quantificação do método global (MQL) SPE-UPLC-ESI-MS/MS. A determinação do MQL é calculada de acordo com a equação 6-1:

$$MQL = \frac{Cp}{Fc} \times \frac{100}{Rec} \quad (6-1)$$

Em que:

*Cp* – Concentração do composto no padrão de calibração (µg/L), correspondente ao padrão de menor concentração

*Fc* – Fator de concentração (250)

*Rec* – Percentagem de recuperação global (%)

### 6.2.8 Exatidão do Método Global

Para avaliar a exatidão do método de ensaio, além de serem realizados ensaios de recuperação do analito, realizaram-se três ensaios interlaboratoriais organizados pela *Aquachek*. Estes ensaios têm por comparação a exatidão do resultado obtido pelo laboratório, com o valor de referência do material em estudo.

A preparação das amostras a serem analisadas procedeu conforme as instruções do *Aquachek*, sendo diluídos 50 µL das soluções de referência em 500 mL da matriz enviada para o ensaio (fator de diluição de 10.000), contendo 80 µL da solução padrão conjunta dos “*surrogate*”, descrita em 6.2.3.2.4. Procedeu-se a três ensaios independentes como descrito em 6.2.4.4.

A expressão dos resultados obtidos levou em conta o fator de concentração do método e a recuperação média do dia obtida para o analito de interesse. Desta forma, efetuaram-se três ensaios de recuperação, onde 0,5 mL da solução padrão intermédia de fortificação ao LOQ, descrita em 6.2.3.6.2, foram adicionados em 500 mL da matriz, contendo 80 µL da solução padrão conjunta dos “*surrogate*”, descrita em 6.2.3.2.4. Procedeu-se ao ensaio como descrito em 6.2.4.4. De seguida calculou-se o valor médio e o erro relativo (%).

### 6.2.9 Incerteza Expandida do Método

O cálculo das incertezas expandidas do método de análise dos pesticidas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS foram realizadas com base nas abordagens “*bottom-up*” (passo a passo) e “*top-down*” (usa como base dados de estudos de precisão e de exatidão) (anexo 9).

### 6.2.10 Análise de Amostras

As amostras analisadas no presente estudo foram recolhidas em duplicado, em frascos de vidro de 2 L e armazenadas a  $5 \pm 3$  °C. Uma vez que alguns pesticidas são sensíveis à presença de luz e facilmente hidrolisáveis, as amostras devem ser recolhidas em frascos de cor âmbar, tratados com tiosulfato de sódio (águas para consumo humano). As amostras foram extraídas no prazo de 7 dias após a amostragem e analisadas por UPLC-ESI-MS/MS no prazo de 40 dias após a extração.

A análise das amostras é efetuada pela calibração do sistema cromatográfico através do método do padrão externo ou com padrão interno, sendo a calibração interna realizada para uma minoria de pesticidas.

#### **6.2.10.1 Ensaio em Branco**

Para cada série de amostras (máximo 15 amostra) efetua-se em simultâneo um ensaio em branco, que integra todo o processo analítico. Para este ensaio usou-se cerca de 500 mL de água ultra-pura com cerca de 150 mg/L de tiosulfato de sódio e procedeu-se ao ensaio como descrito em 6.2.4.4.

#### **6.2.10.2 Ensaio de Recuperação**

Por cada série de amostras analisadas (máximo 15 amostras) efetua-se para uma amostra um ensaio de recuperação em duplicado. Para tal, adicionou-se 0,5 mL da solução padrão intermédia de fortificação ao LOQ, descrita em 6.2.3.6.2, e 80 µL da solução padrão intermédia dos “*surrogate*”, descrita em 6.2.3.2.4, a 500 mL da amostra a analisar e procedeu-se ao ensaio como descrito em 6.2.4.4. Nos ensaios de recuperação a fortificação da amostra é efetuada a uma concentração próxima do limite de quantificação do método de cada composto em análise.

#### **6.2.10.3 Análise de Padrões de Controlo**

As soluções padrão de controlo são independentes dos padrões de calibração, e devem ser analisadas entre cada 10 amostras e no final de cada série de análise.

A preparação das soluções padrão de controlo foram realizadas em semelhança às soluções padrão para o estudo da linearidade (P1, PCI e P7), descritas em 6.2.3.5. Essas soluções são independentes dos padrões de calibração e preparadas em cada dia de análise.

#### **6.2.10.4 Critérios de Aceitação dos Resultados**

Como metodologia de identificação, foram utilizadas as seguintes variáveis e respetivos critérios de aceitação:

a) Tempo de retenção

O tempo de retenção médio é calculado com base nos tempos de retenção dos padrões de calibração e não deve apresentar um coeficiente de variação superior a 0,5%

O critério para confirmação da presença de um determinado pesticida numa amostra com base no tempo de retenção, é estabelecido como o tempo de retenção médio obtido para cada pesticida na solução de calibração  $\pm 0,2$  min.

b) Razão de confirmação

Uma vez que cada composto apresenta uma razão MRM1/MRM2 característica, este método de identificação pode ser utilizado para confirmação da presença de um determinado composto-alvo, sempre que se suspeite da sua presença.

A razão de confirmação média para um determinado pesticida é calculada em cada sequência de trabalho tendo em consideração as razões entre MRM1 e MRM2 para cada padrão de calibração e devem apresentar um coeficiente de variação inferior a 15%.

O critério para confirmação da presença de cada pesticida é estabelecido tendo em consideração o seu valor médio de confirmação  $\pm 20\%$ .

c) Ensaio em branco

O ensaio em branco é aceite se a linha de base do cromatograma não registar o aparecimento de qualquer pico com o mesmo tempo de retenção dos compostos em análise ou se surgir um pico com o mesmo tempo de retenção, mas com uma área inferior a 1/3 da área do padrão de menor concentração da gama de linearidade.

d) Ensaio de recuperação

Uma vez que os compostos em análise apresentam diferentes propriedades, as percentagens de recuperação obtidas para cada um deles são distintas. Os compostos em análise deverão apresentar percentagens de recuperação compreendidas entre  $\pm 25\%$  do valor definido na tabela 6.23.



**Tabela 6.23:** Critérios de aceitação da recuperação absoluta em função da recuperação média obtida para cada pesticida (Recuperação  $\pm$  25%).

Pesticidas	Valor mínimo de aceitação da recuperação (%)	Recuperação média absoluta (%)	Valor máximo de aceitação da recuperação (%)
Oxamil	49	65	81
Bentazona	75	100	125
Desetilsimazina	73	97	121
Imidaclopride	64	85	106
Dimetoato	43	57	71
Cimoxanil	44	59	74
Desetilatrastina	47	63	79
Carbendazima	67	89	111
MCPA	74	99	124
2,4-D	76	101	126
Triclopir	70	93	116
Carbofurão	69	92	115
Desetilterbutilazina	49	65	81
Clortolurão	50	66	83
Isoproturão	47	63	79
Diurão	51	68	85
Metidatião	45	60	75
Linurão	48	64	80
Metiocarbe	42	56	70
Propanil	54	72	90
Pirimetanil	44	59	74
Tetraconazole	56	74	93
Dimoxistrobina	53	70	88
Famoxadona	38	51	64
Tebuconazole	62	83	104
Penconazole	53	71	89
Imazalil	44	58	73
Metconazole	60	80	100
Procloraz	53	71	89
Ipconazole	58	77	96
Oxadiazão	41	55	69

## e) Ensaios de recuperação em duplicado

O ensaio em duplicado do ensaio de recuperação é aceite sempre que as percentagens de recuperação dos pesticidas apresentarem uma amplitude relativa igual ou inferior a 25%.

## f) Solução padrão de controlo de pesticidas

O ensaio não é aceite sempre que as concentrações determinadas para os pesticidas na solução padrão de controlo de pesticidas apresentarem um desvio superior a 20% do valor de referência, devendo ser rejeitadas e reanalisadas todas as amostras injetadas entre os padrões de controlo em causa.

## 6.3 Determinação Quantitativa de Fármacos por SPE-UPLC-ESI-MS/MS

### 6.3.1 Equipamento e Material

#### 6.3.1.1 Equipamento

- Cromatógrafo líquido de ultra resolução UPLC, modelo Acquity System Waters, equipado com:
  - *Software* MassLynx versão 4.1 SCN714, Micromass Ltd
  - Bomba quaternária
  - Injetor automático
  - Compartimento termostaticado para a coluna
- Espectrómetro de massa (MS/MS) modelo Acquity TQD da Waters, equipado com:
  - Sonda de ionização por *electrospray*
  - Analisador do tipo triplo quadrupolo
  - Multiplicador de eletrões
- Balança Analítica, modelo XS204, Mettler Toledo
- Agitador Vortex, modelo MS3 digital, IKA
- Sistema de obtenção de água ultra pura, modelo Milli-Q Q-POD®, Millipore
- Sistema de evaporação sob fluxo de azoto, modelo *Turbo Vap II*, Zymark
- Banho Ultra-Sons, VWR
- Sistema de extração de amostras em fase sólida (SPE), modelo Auto Trace 280, Dionex

#### 6.3.1.2 Material

Nesta secção descreve-se o material específico utilizado na aplicação desta metodologia, não sendo referidos materiais de uso corrente de laboratório.

- Coluna cromatográfica, ACQUITY BEH C18; 1,7  $\mu\text{m}$ , Waters (2,1 mm×50 mm)

- Vials de vidro (volume reduzido), âmbar, com roscas de politetrafluoretileno e septos de silicone, Supelco
- Seringa eletrônica de 100 µL e 500 µL, modelo eVol® XR, SGE Analytical Science
- Cartucho de extração Oasis® HLB, 6 mL, 200 mg, Waters
- Filtro de papel de microfibras de vidro, 47 mm de diâmetro, tamanho de partícula 2 µm

### 6.3.2 Reagentes

#### 6.3.2.1 Reagentes Gerais

- Água Ultra Pura
- Acetato de Amônia,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , *p.a.*,  $\geq 98\%$ , Merck
- Ácido Fórmico,  $\text{HCOOH}$ , *p.a.*,  $\geq 98\%$ , Carlo Herba Reagents
- Metanol,  $\text{CH}_3\text{OH}$ , Lichrosolv®, *p.a.*,  $\geq 99,9\%$ , Carlo Herba Reagents
- Solução de Amônia 25%,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , *p.a.*, Sigma-Aldrich

#### 6.3.2.2 Padrões Primários

- Clotrimazol,  $\text{C}_{22}\text{H}_{17}\text{ClN}_2$ , Pestanal®, *p.a.*,  $\geq 100\%$ , Sigma-Aldrich
- Fluconazol,  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}$ , Pestanal®, *p.a.*,  $\geq 100\%$ , Sigma-Aldrich
- Miconazol,  $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O}$ , *p.a.*,  $\geq 100\%$ , USP

### 6.3.3 Preparação de Soluções

#### 6.3.3.1 Fase Móvel

No decorrer do desenvolvimento dos estudos realizados no equipamento UPLC-ESI-MS/MS, de forma a aumentar a sensibilidade do método e obter um bom perfil cromatográfico para todos os fármacos, foram utilizadas duas fases móveis, cada uma composta por dois solventes, como se pode observar na tabela 6.24.

**Tabela 6.24:** Fase móvel do UPLC para análise de fármacos.

Fase Móvel	Solvente A	Solvente B
Método Ácido	Água + 0,05 mM Acetato de Amónia + 0,05% Ácido Fórmico (v/v)	Metanol
Método Básico	Água + 0,05 % Solução de Amoníaco 25%	Metanol

Para proceder à preparação do solvente A do método ácido, preparou-se previamente uma solução aquosa de acetato de amónia 5 mM, onde dissolveu-se 0,19225g de acetato de amónia em um balão volumétrico de 500 mL contendo água ultra-pura. Em seguida, para um balão de 1000 mL adicionou-se 20 mL da solução aquosa de acetato de amónia 5 mM e 5 mL de ácido fórmico, perfazendo o volume com água ultra-pura.

Para a preparação do solvente A do método básico, adicionou-se 0,5 mL de solução de amónia a 25% a 1000 mL de água ultra-pura.

Os solventes foram filtrados em sistema de vácuo, recorrendo a uma membrana filtrante de celulose com 2 µm de porosidade.

### 6.3.3.2 Soluções Padrão

#### 6.3.3.2.1 Soluções Mãe dos Fármacos

Para as soluções mãe, cerca de 20 mg de cada fármaco foi pesado e transferido para um balão volumétrico de 50 mL. De seguida, o conteúdo foi dissolvido com metanol e o balão volumétrico aferido. Estas soluções foram armazenadas em um frigorífico, ao abrigo da luz, a uma temperatura entre 2 a 8 °C.

A tabela 6.25 apresenta a concentração de cada solução mãe.

**Tabela 6.25:** Concentração das soluções mãe de fármacos para análise por UPLC-MS/MS.

Pesticida	Massa de Padrão pesada (g)	Volume Final ( mL )	Concentração ( mg/L )
Fluconazol	0,0204	50	408
Clotrimazol	0,0208	50	416
Miconazol	0,0207	50	414

### 6.3.3.2 Solução Padrão Conjunta dos Fármacos

A solução padrão conjunta foi preparada transferindo, com a ajuda de uma pipeta adequada, a quantidade necessária de cada uma das soluções mãe (6.3.3.2.1), para um balão volumétrico de 50 mL, perfazendo o volume com metanol.

A tabela 6.26 apresenta a concentração de cada pesticida na solução padrão conjunta.

**Tabela 6.26:** Concentração da solução padrão conjunta de fármacos para análise por UPLC-MS/MS.

Pesticida	Concentração Solução Mãe (mg/L)	Volume ( µL )	Volume Final (mL)	Concentração (mg/L)
Fluconazol	408	481	50	4,0
Clotrimazol	416	123	50	1,0
Miconazol	414	700	50	5,8

### 6.3.3.3 Soluções para a Otimização das Condições de Operação do Espectrômetro de Massa

#### 6.3.3.3.1 Soluções Padrão Individuais para Infusões

Para cada fármaco, foi preparada uma solução padrão individual para infusão, com uma concentração próxima a 1 mg/L, a partir das soluções mãe descritas em 6.3.3.2.1, utilizando o metanol como solvente de diluição.

#### 6.3.3.4 Soluções Padrão para Validação da Gama de Trabalho

##### 6.3.3.4.1 Soluções Padrão de Trabalho para Estudos da Linearidade em Solvente

As soluções padrão de trabalho usadas para estudos de linearidade em solvente do método analítico foram preparadas por diluição da solução padrão conjunta dos fármacos (6.3.3.2.2) em água ultra-pura. Foram preparadas 5 soluções padrão de trabalho para a validação, como se pode observar na tabela 6.27.

**Tabela 6.27:** Concentração de cada fármaco nas soluções padrão de trabalho para estudo da linearidade.

Fármaco	Concentração Solução Conjunta (mg/L)	P1	P2	P3 (µg/L)	P4	P5
Fluconazol	1,0	1,5	3,0	5,0	6,0	8,0
Clotrimazol	4,0	6,0	12,0	20,0	24,0	32,0
Miconazol	5,8	8,7	17,4	29,0	34,8	46,4

**Nota:**

**Solução padrão de trabalho P1** – Diluir 30 µL da solução padrão conjunta para um balão volumétrico de 20 mL;

**Solução padrão de trabalho P2** – Diluir 30 µL da solução padrão conjunta para um balão volumétrico de 10 mL;

**Solução padrão de trabalho P3** – Diluir 50 µL da solução padrão conjunta para um balão volumétrico de 10 mL;

**Solução padrão de trabalho P4** – Diluir 60 µL da solução padrão conjunta para um balão volumétrico de 10 mL;

**Solução padrão de trabalho P5** – Diluir 80 µL da solução padrão conjunta para um balão volumétrico de 10 mL;

#### **6.3.3.4.2 Soluções Padrão de Trabalho para Estudos da Linearidade em Matriz Ajustada**

Para cada vial de leitura, diluir em partes iguais 100 µL de padrão (solução preparada em 6.3.3.4.1) com 100 µL de extrato da amostra. A concentração real dos padrões preparados corresponde a metade das concentrações das soluções apresentadas na tabela 6.27. O extrato da amostra é igualmente sujeito ao passo de diluição em água ultra-pura na proporção 1:1 (100 µL de solvente + 100 µL de extrato da amostra), sendo incluído na curva de calibração com a concentração de 0 µg/L e denominação P0.

### **6.3.4 Método Analítico SPE-UPLC-ESI-MS/MS**

Dispondo a EPAL de um método já implementado para a análise de um conjunto de fármacos por UPLC-MS/MS, foram realizados apenas alguns ajustes nas condições do espectrómetro de massa, de maneira a obter a melhor resposta e sensibilidade para os respectivos fármacos.

#### **6.3.4.1 Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa**

A otimização das condições de formação do ião precursor de cada fármaco, foram realizadas de modo muito semelhante a otimização realizada para os pesticidas. A diferença consiste na *tune* do espectrómetro de massas, onde é necessário desligar o gás de colisão (árgon), sendo realizado o *full scan* para o primeiro quadrupolo, de forma a verificar todos os iões precursores possíveis para cada composto.

Neste estudo fez-se variar a voltagem do cone do espectrómetro de massa para cada um dos compostos, em modo de ionização positiva, entre 5 e 45 V. Este ensaio permitiu a determinação da voltagem de cone ótima para a formação do ião precursor de cada composto com maior intensidade de sinal.

A fase seguinte da otimização consistiu na escolha dos iões produtos a partir do ião precursor escolhido para cada analito.

Após definida a voltagem ótima do cone para a formação de cada ião precursor dos analitos, o gás de colisão foi ligado novamente, fez-se a programação para que o primeiro quadrupolo operasse em modo SIM, permitindo a passagem do ião precursor escolhido, enquanto o terceiro quadrupolo passou a operar em modo *full scan*, a fim de avaliar o efeito da energia de colisão, de forma a verificar os fragmentos resultantes da fragmentação do ião precursor. Neste passo, fez-se variar a energia de colisão entre 5 e 31 eV na célula de colisão (segundo quadrupolo).

A escolha da energia de colisão foi baseada na escolha dos iões produtos com maior intensidade de sinal estando, ao menos, 10% ou mais da intensidade de sinal do ião precursor presente. Deve-se, sempre que possível, escolher iões produtos provenientes do mesmo ião precursor.

Seguida as etapas da otimização, foram reunidas as condições para a definição das duas transições para cada analito em estudo (MRM1 e MRM2).

#### 6.3.4.2 Condições Cromatográficas

A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna ACQUITY UPLC BEH C18 1.7  $\mu\text{m}$ , utilizando os gradientes apresentados na figura 6.3 para o método ácido e básico, respetivamente.

Gradient:

	Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
1	Initial	0.300	95.0	5.0	Initial
2	2.00	0.300	70.0	30.0	6
3	3.00	0.300	50.0	50.0	6
4	5.00	0.300	30.0	70.0	6
5	6.00	0.300	10.0	90.0	6
6	8.00	0.300	95.0	5.0	6
7	8.50	0.300	95.0	5.0	6

(a) Gradiente do método ácido

Gradient:

	Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B	Curve
1	Initial	0.500	70.0	30.0	Initial
2	2.00	0.500	50.0	50.0	6
3	4.00	0.500	30.0	70.0	6
4	6.00	0.500	10.0	90.0	6
5	7.00	0.500	70.0	30.0	6
6	8.50	0.500	70.0	30.0	6

(b) Gradiente do método básico

**Figura 6.3:** Gradiente das fases móveis para o método ácido (a) e para o método básico (b).

Na tabela 6.28, encontram-se apresentadas as condições cromatográficas utilizadas na validação do método.

**Tabela 6.28:** Condições Cromatográficas.

Volume de Injeção	20 µL
<b>Fluxo do Eluente (método ácido)</b>	<b>0,3 mL/min</b>
Fluxo do Eluente (método básico)	0,5 mL/min
<b>Tempo de Análise (método ácido/básico)</b>	<b>8,5 min</b>
Temperatura da Coluna	40 °C

### 6.3.4.3 Condições do Espectrômetro de Massa

#### 6.3.4.3.1 Condições do “MS Method”

As voltagens de cone utilizadas para a formação do íon precursor para cada composto, bem como os íões produtos referentes às transições de quantificação (MRM1) e de qualificação (MRM2) e as respectivas energias de colisão são apresentadas na tabela 6.29.

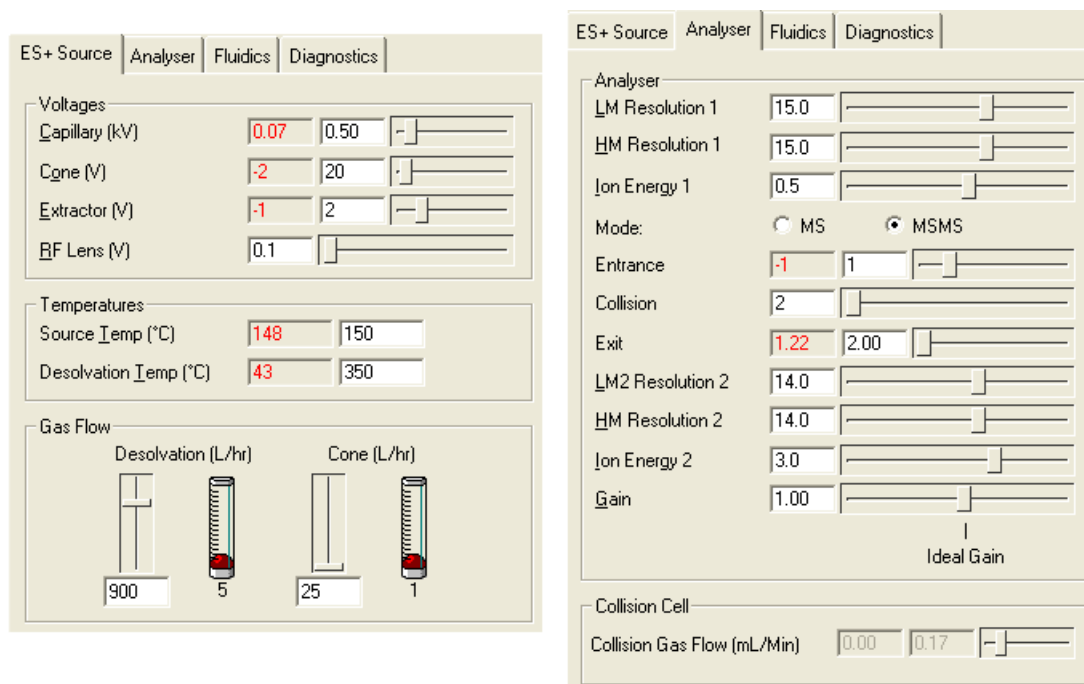
**Tabela 6.29:** Método criado no *software* do equipamento para análise dos fármacos por UPLC-ESI-MS/MS.

Fármaco	Janela de retenção (min)	Janela de retenção (min)	Voltagem de Cone (V)	Transição MRM		Energia de Colisão (eV)
	Método Ácido	Método Básico		Ião Precursor - Ião Produto		
Fluconazol	2,10 – 4,10	0,00 – 2,00	25	MRM 1	307,0 → 220,0	17
				MRM 2	307,0 → 238,1	15
<b>Clotrimazol</b>	<b>3,60 – 5,60</b>	<b>3,80 – 5,80</b>	<b>15</b>	<b>MRM 1</b>	<b>277,1 → 165,0</b>	<b>21</b>
				<b>MRM 2</b>	<b>277,1 → 199,1</b>	<b>23</b>
Miconazol	4,80 – 6,10	5,00 – 7,00	40	MRM 1	416,9 → 160,8	25
				MRM 2	416,9 → 69,0	25

#### 6.3.4.3.2 Condições de Operação da *Tune Page*

Na *Tune Page* foram programadas as condições referentes à fonte de ionização, e ao analisador de massa. Os valores utilizados tiveram como base os valores *standard* do equipamento, que se encontram apresentados na figura 6.4.





**Figura 6.4:** Condições da *tune page* da fonte de ionização e do analisador de massa.

#### 6.3.4.4 Preparação da Amostra (Extração em Fase Sólida)

A preparação da amostra deve ser efetuada num período de 7 dias após a colheita e a sua análise efetuada num período de 15 dias após a extração.

A preparação das amostras foi realizada com base no método de extração em fase sólida seguido na EPAL (4) num sistema SPE automatizado, utilizando o cartucho de extração OASIS HLB (6 mL, 200 mg). As condições pré-definidas do método utilizadas pelo programa de extração estão apresentadas na tabela 6.30.

**Tabela 6.30:** Condições utilizadas pelo programa de extração por SPE.

<b>Ativação do Cartucho</b>	4 mL de metanol + 4 mL de água ultra-pura a 10 mL/min
<b>Passagem da Amostra</b>	500 mL de amostra a 10 mL/min
<b>Lavagem do Cartucho</b>	3 mL de água ultra pura a 10 mL/min
<b>Secagem do Cartucho</b>	15 minutos com corrente de azoto
<b>Eluição</b>	4 mL + 4 mL de metanol a 5 mL/min

O extrato final é concentrado num sistema de evaporação com corrente de azoto (*TurboVap*), a 0,3 bar e a uma temperatura do banho de água de aproximadamente 35 °C, até à secura. O tubo deve ser rolhado e congelado até o dia da análise cromatográfica. No dia da análise, o tubo deve

repousar à temperatura ambiente, adicionando 0,8 mL de água ultra-pura e em seguida homogeneizar.

### **6.3.5 Validação do Método Analítico UPLC-ESI-MS/MS**

A validação deste método cromatográfico implicou a realização de vários testes com o objetivo de avaliar o intervalo de linearidade e a gama de trabalho para o fluconazol, clotrimazol e miconazol, em cada método (ácido e básico), tendo como objetivo definir o melhor método para cada tipo de fármaco baseando-se na observação da intensidade do sinal, tempo de retenção, razão sinal ruído, e o comportamento das curvas de calibração em matriz ajustada.

#### **6.3.5.1 Testes de Linearidade**

Para a determinação do intervalo de linearidade, foram analisadas soluções padrões de trabalho, numa gama de concentração entre 1,5 a 816 µg/L.

Os resultados obtidos foram tratados através de uma regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, de acordo com a norma ISO 8466-1, obtendo-se uma reta de calibração (área vs concentração). Os testes estatísticos aplicados e os critérios de aceitação internos estabelecidos para aceitação dos resultados foram os descritos no ponto 6.1.5 (97).



## Capítulo 7 – Resultados e Discussão

### 7.1 Determinação Quantitativa de Pesticidas por GC/MS

Para validar um método cromatográfico, é necessário começar por otimizar e/ou ajustar os parâmetros cromatográficos. Visto que, a EPAL possui um método de ensaio, que se encontra implementado em rotina e acreditado para a monitorização de 20 pesticidas e 1 metabolito de um pesticida por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa, optou-se por incluir os novos pesticidas especificados na lista de vigilância ao método já existente, não sendo necessária a criação de um novo método de ensaio para a monitorização dos mesmos.

#### 7.1.1 Validação do Método Cromatográfico

Para avaliar o comportamento dos novos pesticidas, começou por se injetar as soluções mãe descritas em 6.1.3.1 no GC/MS para a identificação dos tempos de retenção respetivos, usando as condições indicadas em 6.1.4.1. Na tabela 7.1, encontra-se o tempo de retenção para cada composto.

**Tabela 7.1:** Tempos de retenção para cada pesticida.

Pesticidas	tr (min)
Tetraconazol	41,03
Penconazol	45,38
Imazalil	51,21
Dimoxistrobina	59,94
Procloraz	61,03
Ipconazol	64,87

É preciso salientar que foi realizado um ajuste no tempo de corrida do método, de maneira a obter um tempo de corrida suficientemente longo para a eluição dos novos pesticidas introduzidos no método. Para que houvesse a eluição de todos os compostos apresentados na tabela 7.1, foi realizado um acréscimo de 9 minutos ao tempo de corrida, totalizando 69.6 minutos. Todavia, para o pesticida famoxadona o processo de validação por este método instrumental não foi possível, pois o mesmo não apresentou sensibilidade suficiente para detetar o composto a baixas concentrações no modo *full scan*.

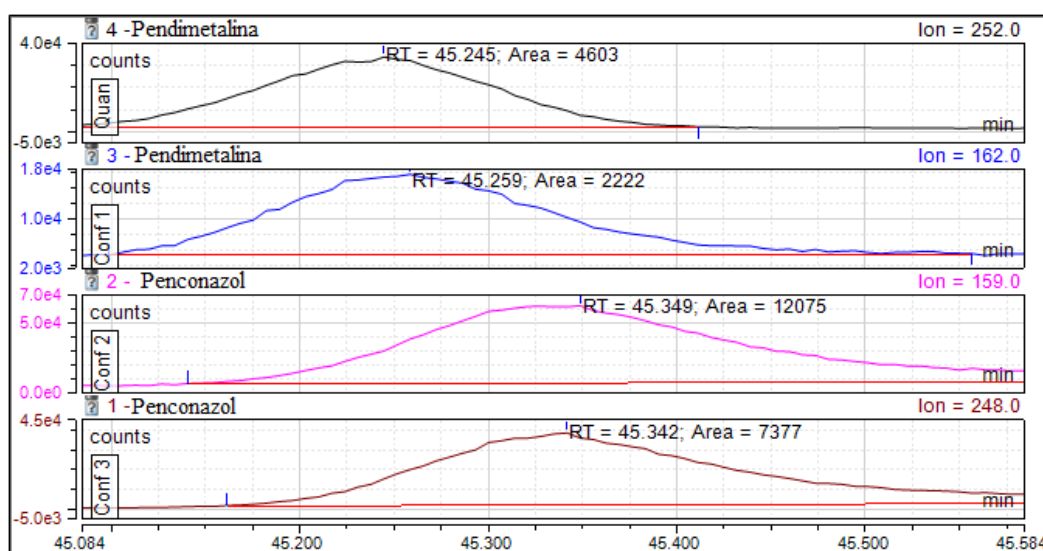
Nesta fase do trabalho, foi usada a biblioteca de espectros disponível no *software*, de forma a identificar os compostos injetados.

Após a análise dos espectros de massa obtidos pelas injeções individuais, e comparação com os espectros de massa respetivos existentes na biblioteca de espectros (NIST) juntamente com dados

obtidos de outros estudos publicados (100–102), foram escolhidos os íons de quantificação e qualificação para os novos pesticidas, de forma a definir as condições do espectro de massa apresentados na tabela 6.6.

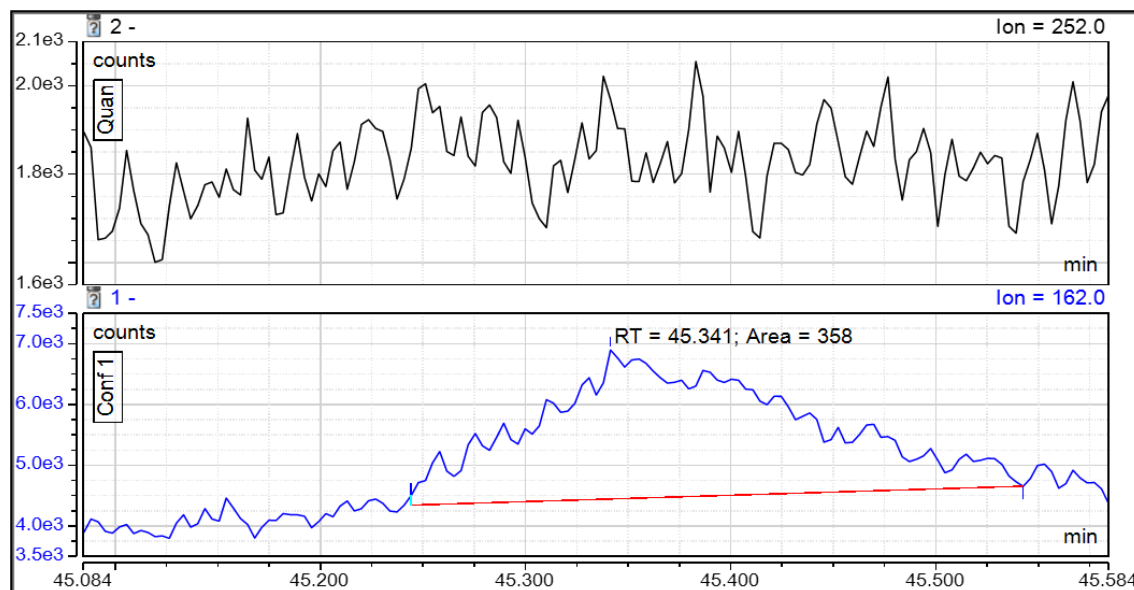
De modo a avaliar o comportamento dos novos pesticidas, juntamente com os pesticidas monitorizados pela EPAL, foi preparada uma solução padrão conjunta contendo os 27 pesticidas em concentrações semelhantes as descritas em 6.1.3.2, e injetou-se no equipamento em modo de aquisição SIM.

Uma vez que o comportamento dos pesticidas monitorizados pela EPAL já era conhecido, uma coeluição entre os compostos penconazol (tr 45,38 min) e pendimetalina (tr 45,25 min), foi confirmada devido aos tempos de retenção muito semelhantes. A coeluição entre os pesticidas pode ser observada na figura 7.1.



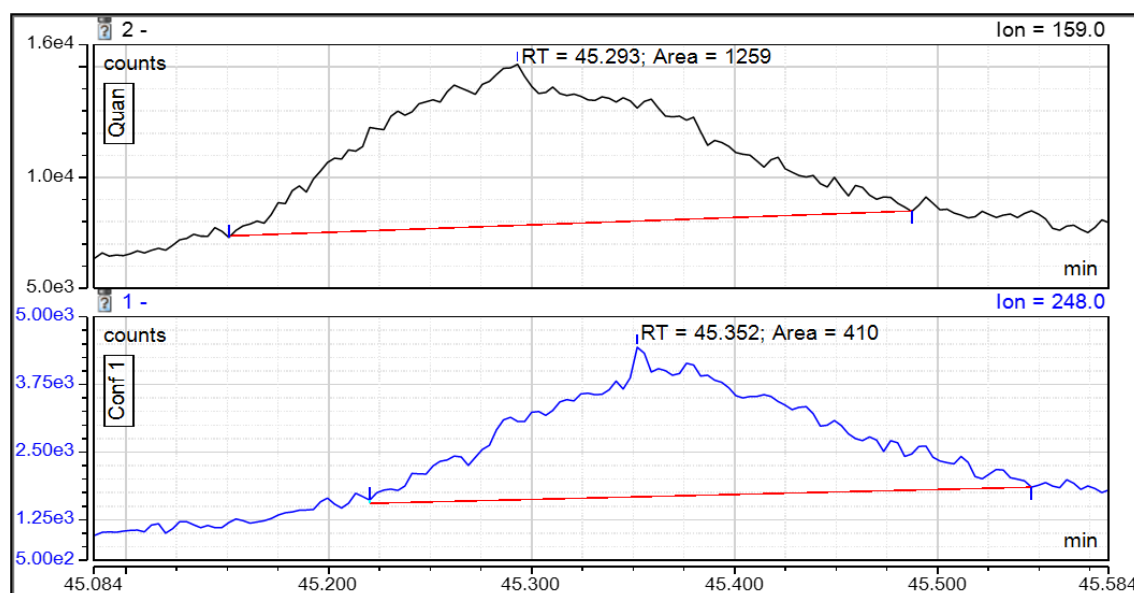
**Figura 7.1:** Resposta equipameto vs tempo para os pesticidas pendimetalina e penconazol.

Após a confirmação da coeluição, decidiu-se avaliar as possíveis interferências dos íões monitorizados para a pendimetalina (162, 252\*) face à injeção do penconazol. A figura 7.2 mostra o cromatograma obtido, sendo possível concluir que não há interferências.



**Figura 7.2:** Resposta do equipamento vs tempo para o pesticida penconazol em modo de aquisição SIM dos íons 162 e 252\* da pendimetalina.

Da mesma maneira, foi realizado o procedimento inverso para avaliação das possíveis interferências dos íons do penconazol (159\*, 248) face à injeção da pendimetalina. O cromatograma obtido está apresentado na figura 7.3, onde é possível verificar a existência da interferência do íon de quantificação do penconazol (159), correspondendo a 27% da área do pico de quantificação da pendimetalina (252) que pode ser observado na figura 7.1.



**Figura 7.3:** Resposta equipamento vs tempo para o pesticida pendimetalina em modo de aquisição SIM dos íons 159\* e 248 do penconazol.

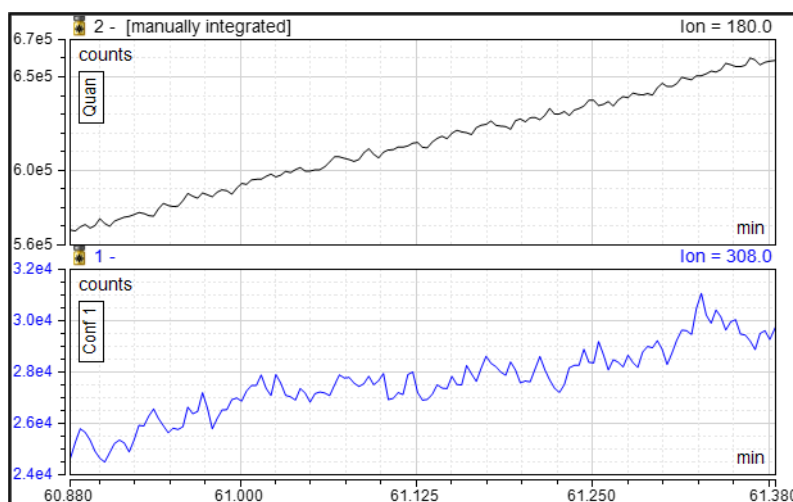
Em conclusão aos resultados obtidos, foi descartada a possibilidade de realizar o processo de validação para o pesticida penconazol por GC/MS, havendo a possibilidade do mesmo ser analisado por LC-MS/MS.

#### 7.1.1.1 Estudos de Linearidade dos Pesticidas

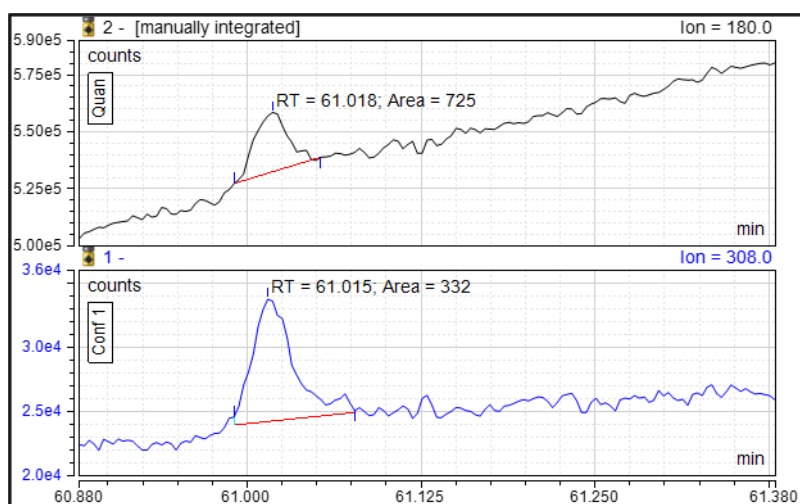
Para a validação de um método cromatográfico, o primeiro passo consiste no estudo da linearidade, que tem por objetivo avaliar a resposta do detetor face à variação das concentrações de um dado composto, uma vez que, o método já possui uma gama de trabalho definida, as soluções utilizadas para os estudos da linearidade variaram suas concentrações dentro desta gama.

A linearidade pode ser testada recorrendo à aplicação de vários testes estatísticos. Inicialmente é representado graficamente a dependência do sinal instrumental para cada um dos analitos em estudo em função da sua concentração após injeção de várias soluções padrões desses compostos descritas em 6.1.3.3.2. A linearidade foi então obtida a partir do método dos mínimos quadrados, adquirindo-se uma curva de calibração para cada composto.

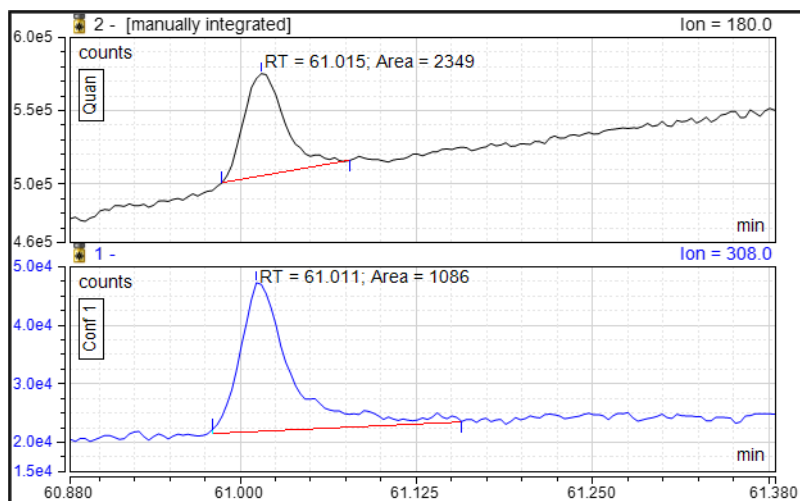
Verificou-se que para o procloraz somente a última solução padrão de trabalho (P7) apresentava melhor sensibilidade e resolução aceitável do pico de quantificação. Para as outras soluções padrão de trabalho (P1 a P6), devido a falta de sensibilidade, não foi possível a quantificação do pesticida, não obtendo desta forma uma curva de calibração para o procloraz dentro da gama de trabalho estudada. As figuras 7.4, 7.5 e 7.6 apresentam o cromatograma obtido para o procloraz quando injetadas as soluções padrão de trabalho P1, P5 e P7, respetivamente.



**Figura 7.4:** Resposta do equipamento vs tempo para a solução padrão de trabalho P1.



**Figura 7.5:** Resposta do equipamento vs tempo para a solução padrão de trabalho P5.

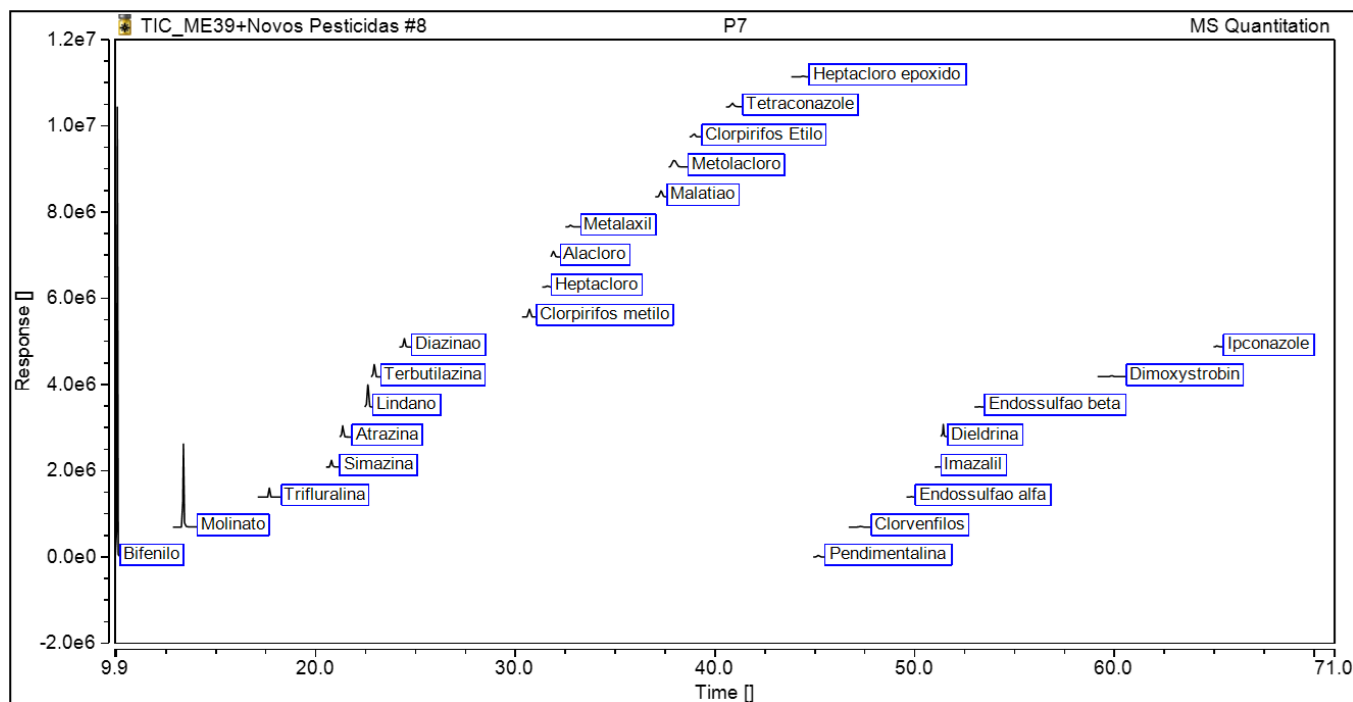


**Figura 7.6:** Resposta do equipamento vs tempo para a solução padrão de trabalho P7.

Uma alternativa de análise para o pesticida procloraz, visto que o método apresenta sensibilidade para a última solução padrão de trabalho, seria estudar a linearidade do pesticida em uma gama de trabalho mais alta, implicando na criação de um novo método cromatográfico e consequentemente modificações na preparação da amostra para o pesticida em questão, pelo que se optou por analisar o composto por LC-MS/MS.

O traçado de corrente iônica (TIC) obtido para pesticidas restantes, nomeadamente, tetraconazol, dimoxistrobina, imazalil e ipconazol, juntamente com os outros 21 pesticidas monitorizados pela EPAL pode ser observado na figura 7.7.





**Figura 7.7:** TIC típico da solução padrão de trabalho P7 em modo SIM.

O tempo de retenção dos compostos monitorizados em rotina pela EPAL podem ser observados na tabela 7.2.

**Tabela 7.2:** Tempo de retenção para os pesticidas monitorizados por GC/MS (método interno da EPAL).

Pesticidas	tr (min)	Pesticidas	tr (min)
Bifenilo	10.06	Metalaxil	32.85
Molinato	13.39	Malatiao	37.36
Trifluralina	17.71	Metolaclo	38.01
Simazina	20.83	Clorpirifos-etilo	39.01
Atrazina	21.40	Heptacloro epóxido	44.50
Lindano	22.65	Pendimentalina	45.25
Terbutilazina	22.97	Clorfeninfos	47.41
Diazinão	24.49	Endossulfão alfa	49.87
Clorpirifos-metilo	30.76	Dieldrina	51.46
Heptacloro	31.67	Endossulfão beta	53.27
Alacloro	31.97		

Na tabela 7.3, estão discriminadas as equações das retas e os coeficientes de determinação obtidos, assim como a gama de trabalho para os quatro pesticidas em estudo.

**Tabela 7.3:** Gama de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação para os novos pesticidas por GC/MS.

Pesticidas	Gama de Linearidade (µg/L)	Número de pontos	Equação da reta	Coefficiente de Determinação (R <sup>2</sup> )
Tetraconazol	18,6 - 163,9	7	$y = 168,5958x - 611,059$	0,9932
Imazalil	18,9 - 166,3	7	$y = 9,1458x - 117,8012$	0,9857
Dimoxistrobina	19,0 - 167,1	7	$y = 102,1737x + 19,6494$	0,9944
Ipconazol	19,0 - 166,9	6	$y = 24,3095x - 24,7616$	0,9970

Pela análise da tabela 7.3 é possível observar que apenas o composto imazalil apresenta um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) abaixo de 0,990 (valor de aceitação interno), entretanto, a reta de calibração por si só não garante a existência de linearidade na gama de concentração estudada, razão pela qual são realizados outros testes estatísticos.

Iniciou-se por aplicar o teste estatístico da análise de resíduos (anexo 4), onde é feita a rejeição dos pontos experimentais com desvios superiores a 15% relativamente aos pontos estimados pela reta de calibração. Em seguida foi aplicado o teste das áreas normalizadas (anexo 5), para admitir a existência da linearidade em uma determinada gama de concentração, onde valores normalizados não compreendidos entre 85% e 115% são rejeitados. Por fim, foi efetuado o teste de RIKILT (anexo 6), que descarta valores que se encontrem fora do intervalo de 90 e 110%.

Os resultados referentes à aplicação dos testes estatísticos acima referidos, encontram-se resumidos na tabela 7.4.

**Tabela 7.4:** Resultados dos testes estatísticos para os novos pesticidas nos estudos de linearidade.

Pesticidas	Análise de Resíduos (%)	Áreas Normalizadas (85-115%)	Teste de RIKILT (90-110%)	Teste de Mandel (VT<F 0,05; 1; N-3)
Tetraconazol	[-8,6; 31,5]	[91,6; 114,7]	[89; 111]	12,21 > 7,71
Imazalil	[-19,9; 152,5]	[92,1; 139,5]	[82; 124]	14,11 > 7,71
Dimoxistrobina	[-8,3; 24,9]	[79,0; 108,4]	[89; 122]	15,75 > 7,71
Ipconazol	[-11,2; 16,7]	[89,5; 113,9]	[87; 111]	2,66 < 10,13

Como se pode observar pelos resultados da tabela 7.4, todos os pesticidas apresentam desvios superiores a 15% para o teste da análise de resíduos, e os critérios de aceitação para o teste de RIKILT não são respeitados.

Para verificar a existência de linearidade foi ainda aplicado o teste de Mandel (anexo 7), de acordo com a norma ISO 8466-1. Este teste estatístico utiliza os dados experimentais para verificar se melhor se aplica uma função de calibração linear ou uma função polinomial de 2º grau. O valor teste (VT), é calculado e comparado com o valor tabelado na distribuição F de *Fischer-Snedecor*. Se  $VT \leq F$ , conclui-se que a função é linear e corresponde a um bom ajuste dos pontos experimentais. Os resultados apresentados na tabela 7.4 para o teste de Mandel aponta apenas um bom ajuste linear para o ipconazol.

Em forma de conclusão, devido à falta de resultados aceitáveis para os testes estatísticos realizados para os novos pesticidas a ser implementados, foi necessário abandonar os estudos realizados. Neste sentido, optou-se por desenvolver a implementação dos pesticidas por LC-MS/MS.

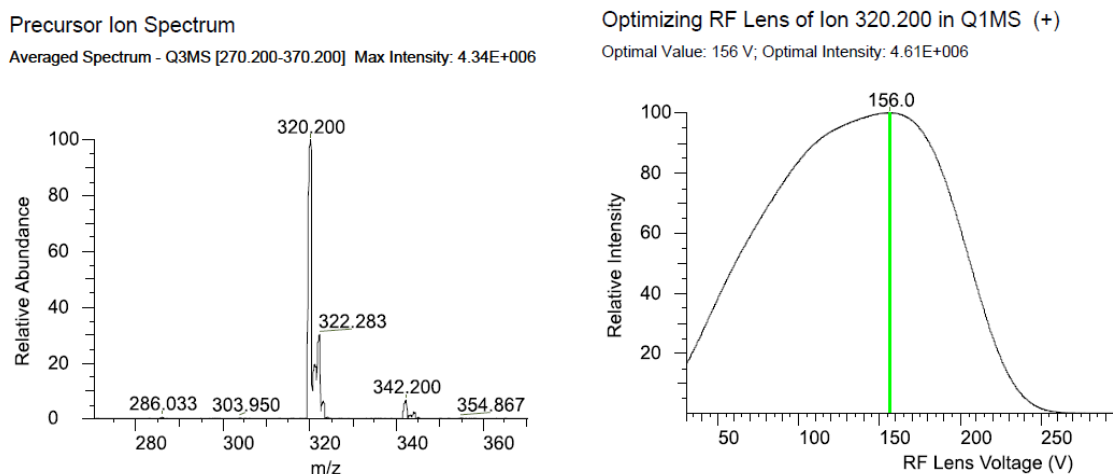
## 7.2 Determinação Quantitativa de Pesticidas por SPE-UPLC-ESI-MS/MS

Para demonstrar a existência de bases científicas de suporte ao método de ensaio, é necessário a realização do processo de validação do método analítico que envolve o estudo e a otimização de parâmetros. Assim, cabe ao laboratório analisar quais os parâmetros a incluir no plano de validação, perante o tipo de metodologia em questão.

Este estudo teve como objetivo introduzir nove pesticidas publicados na terceira lista de vigilância, em um método já existente em rotina de análises da EPAL. O trabalho foi desenvolvido por otimização das condições do sistema UPLC-ESI-MS/MS visando a sua validação e posterior acreditação.

### 7.2.1 Otimização das Condições do Espectrômetro de Massa

De modo a ser possível atingir o máximo de sensibilidade e seletividade para cada composto alvo, o trabalho experimental iniciou-se pela otimização dos parâmetros relacionados com a formação do íon precursor (que ocorre na fonte de ionização), através da infusão das soluções padrão individuais para infusão descritas em 6.2.3.3.1, com o triplo quadrupolo em modo *full scan* e a ionização em modo positivo. A função “*precursor ion*” permite isolar o íon com maior intensidade de sinal, e o próprio *software* do equipamento apresenta o valor ótimo para a voltagem das lentes, como pode ser observado na figura 7.8.



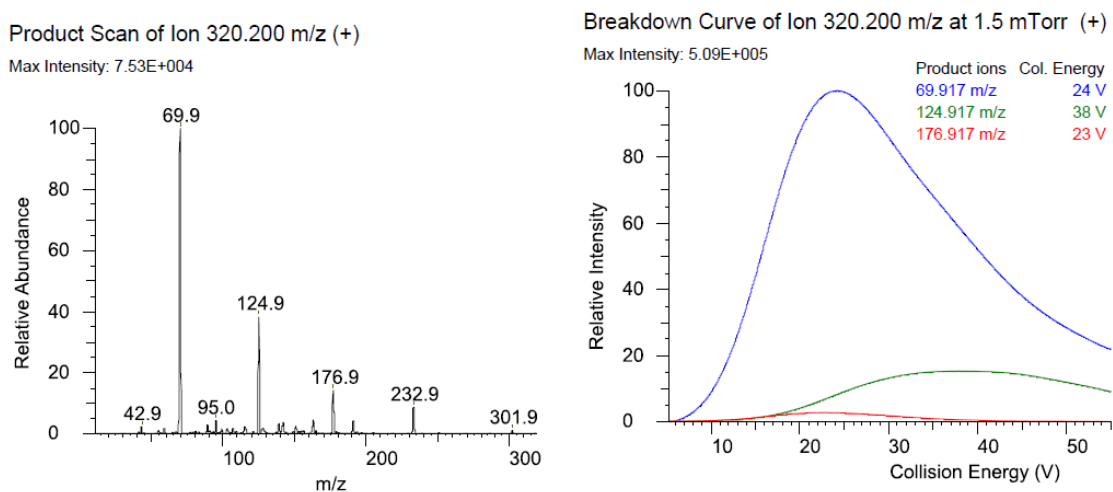
**Figura 7.8:** Otimização do íon precursor para o pesticida Metconazol.

Como alguns pesticidas apresentam propriedades ácidas, nomeadamente, bentazona, MCPA, 2,4-D e triclopir, o ião precursor formado corresponde ao ião molecular desprotonado  $(M-H)^-$ . Por esse motivo, estes compostos foram ionizados em modo negativo.

O modo de operação do triplo quadrupolo utilizado em análises de rotina é o modo MRM. Neste modo de operação, de modo a confirmar a presença de um determinado composto, é realizada a escolha de duas transições (ião precursor e ião produto), utilizando-se a transição MRM1 para análise quantitativa e a transição MRM2 para a qualificação. Sendo assim, torna-se essencial a escolha de dois iões produto de forma a obter as duas transições MRM. Logo, realizou-se a otimização dos iões produto com o triplo quadrupolo a trabalhar em modo *product ion scan*.

Na figura 7.9, encontram-se o espectro de massa para o metconazol obtido no modo *product ion scan* e os valores ótimos da energia de colisão que permitem a obtenção dos iões produto de maior intensidade de sinal.

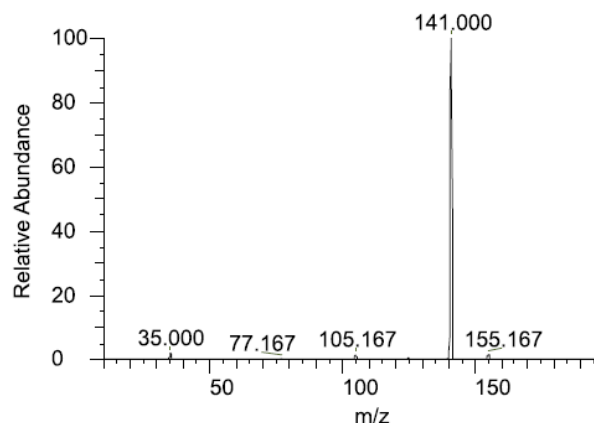
Como podemos observar, existe a presença de mais de dois iões produto, com diferentes intensidades de sinal, sendo escolhido o ião de razão  $m/z$  69,9 para a transição MRM1, e o ião de razão  $m/z$  124,9 para a transição MRM2.



**Figura 7.9:** Otimização dos iões produtos de maior intensidade para o pesticida Metconazol.

No entanto, este comportamento não é verificado para todos os compostos estudados. No caso do MCPA, 2,4-D e triclopir, ocorre a formação de um único ião produto, a partir do ião precursor escolhido, como pode ser observado na figura 7.10.

Product Spectrum  
Averaged Spectrum - Full MS2 Max Intensity: 5.06E+005

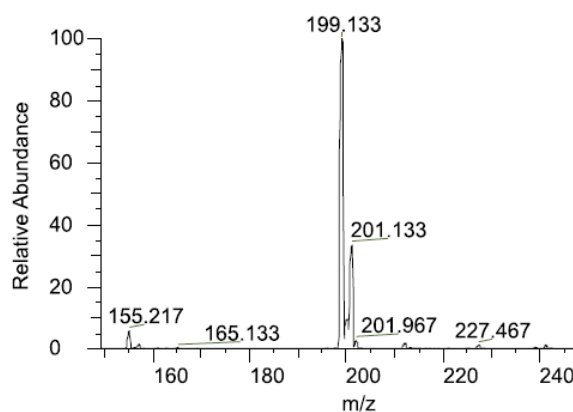


**Figura 7.10:** Espectro de massa do MCPA obtido no modo *product ion scan*.

A presença de uma única fragmentação pode ser relacionada com a estrutura molecular desses compostos, não permitindo que os mesmos originem diversos fragmentos com intensidade de sinal detetável.

Em suas estruturas químicas, o MCPA, 2,4-D e o triclopir apresentam o átomo cloro (Cl), e os seus respectivos espectros de massa obtidos para o ião precursor permitiram identificar iões de massa equivalente à presença de isótopos do cloro  $^{35}\text{Cl}$  e  $^{37}\text{Cl}$ , como mostra a figura 7.11.

Precursor Ion Spectrum  
Averaged Spectrum - Q3MS [149.050-249.050] Max Intensity: 2.19E+006



**Figura 7.11:** Espectro de massa do ião precursor do MCPA obtido em modo *precursor ion scan*.

De maneira a obter duas transições MRM para cada composto, optou-se por escolher dois iões precursores diferentes. Sendo assim, para a transição MRM2 foram escolhidos os iões equivalentes

aos respectivos isótopos do cloro. Procedeu-se do mesmo modo para o pesticida desetilterbutilazina, devido à baixa intensidade de sinal obtido no espectro de massa para a segunda transição.

As duas transições selecionadas para cada composto, energias de colisão e voltagem das lentes definidas para cada composto estão descritas na tabela 6.20.

Devido à grande quantidade de pesticidas analisados no método, optou-se por seguir as instruções do fabricante e utilizar 3500 V no modo positivo e 2500V no modo negativo.

## **7.2.2 Validação do Método Cromatográfico**

### **7.2.2.1 Estudos de Linearidade dos Pesticidas**

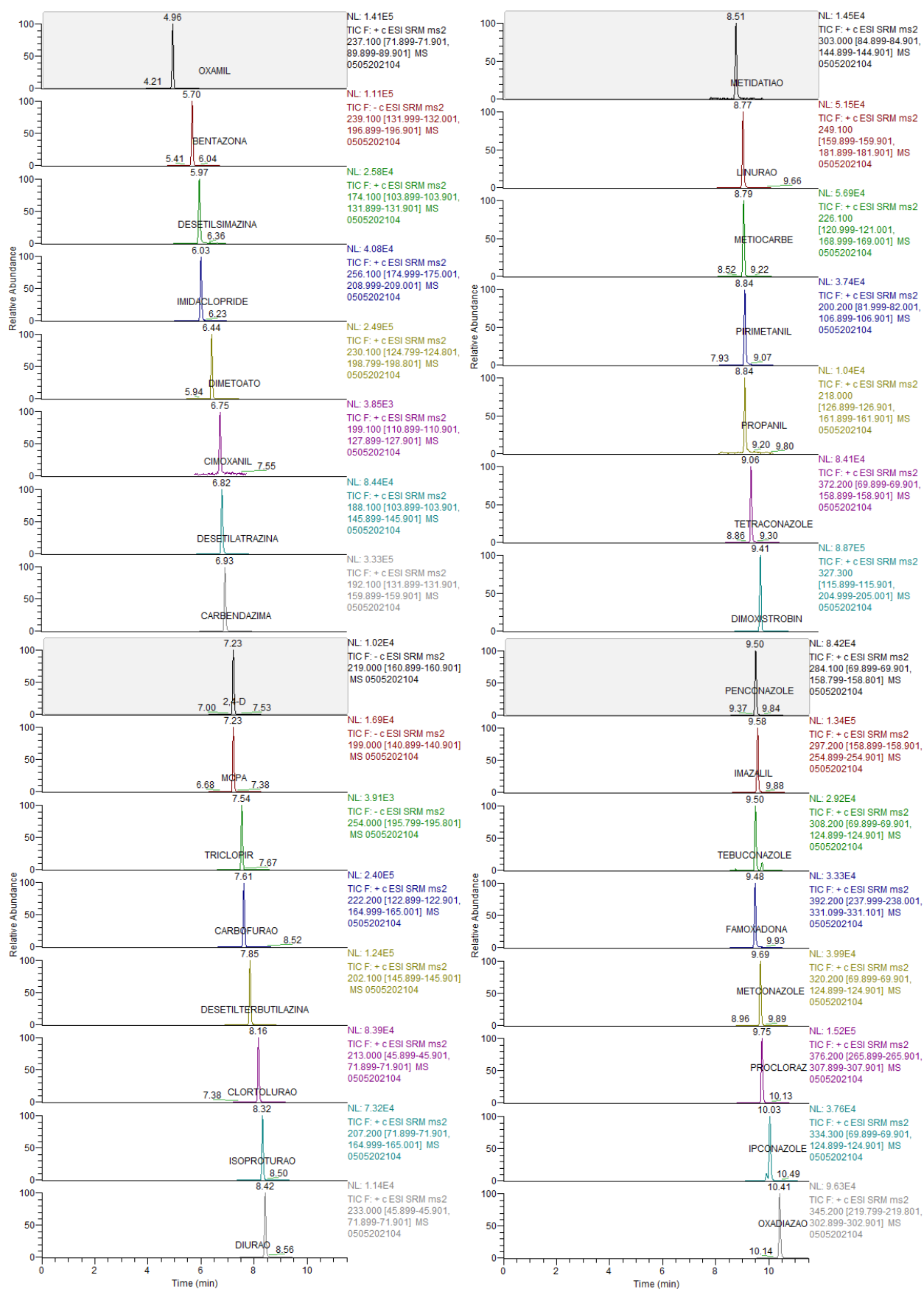
Uma vez definidas as condições cromatográficas, as condições do espectrômetro de massa e as condições de monitorização de cada analito, iniciou-se os estudos de linearidade para os pesticidas pela injeção das soluções padrão de trabalho para validação, descritas em 6.2.3.4.2. As concentrações dos padrões de trabalho variaram dentro da gama de trabalho determinada pelo método já existente no laboratório.

O sistema cromatográfico inicia a aquisição numa determinada pressão inicial, e ao fim da aquisição passa por uma estabilização de maneira a retornar a sua pressão inicial antes da próxima aquisição. Esta estabilização é necessária para que haja precisão dos resultados, uma vez que, ao se injetar um padrão sem a estabilização do sistema os tempos de retenção, a base dos picos e outros fatores podem ser afetados.

Durante os estudos de linearidade, três tipos diferentes de colunas cromatográficas foram utilizadas. As colunas ACQUITY UPLC HSS T3 (1,8  $\mu\text{m}$ ) e Luna Omega (1,6  $\mu\text{m}$ ) apresentaram um aumento contínuo da pressão entre as injeções, não retornando à pressão inicial ao começo de uma nova injeção, pelo que, optou-se por abandonar os estudos com essas colunas.

Uma possível explicação para este fenómeno encontra-se no uso do acetato de amónia adicionado aos solventes e no tamanho das esferas usadas no enchimento de cada coluna. O acetato de amónia é utilizado como um aditivo para o ganho de sinal em alguns compostos e apesar de ser muito solúvel em água, possui uma baixa solubilidade em metanol. Sendo a última linha do gradiente das fases móveis uma mistura de 90% de metanol e 10% de água, é provável que o acetato de amónia possa precipitar dentro da coluna cromatográfica. Visto que, quanto menor o tamanho da esfera menor será o espaço livre entre elas, o sistema necessitou que uma maior pressão fosse aplicada para a passagem dos solventes e amostras, adquirindo assim uma tendência a aumentar a pressão a cada injeção.

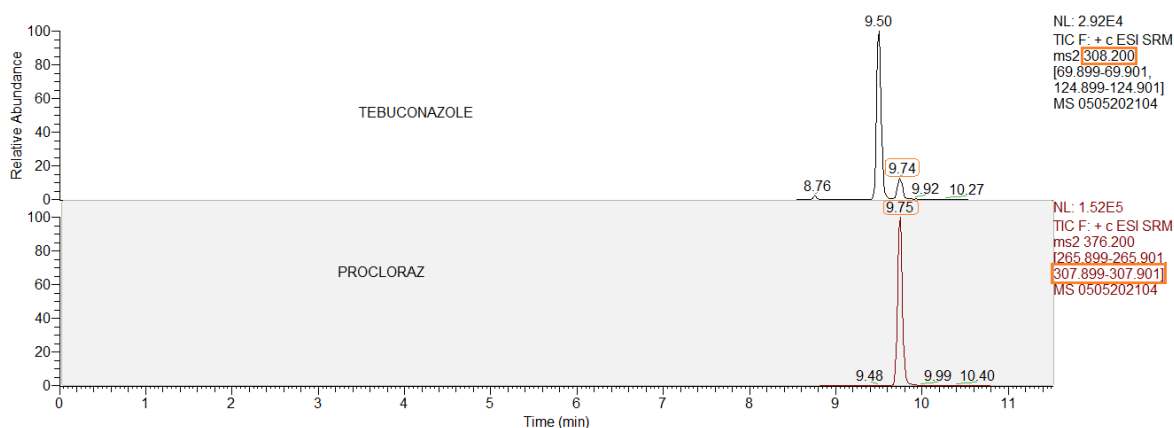
A coluna Atlantis dC18 (5  $\mu$ m) exibiu a mesma pressão ao início de cada injeção, sendo esta escolhida para dar continuidade aos estudos. Na figura 7.12, encontra-se o cromatograma da solução padrão de trabalho, equivalente ao padrão mais baixo da gama de trabalho (P1), resultante das transições MRM1 para cada pesticida nas condições previamente otimizadas.



**Figura 7.12:** Cromatograma da solução padrão de trabalho P1 dos pesticidas, respeitante às transições MRM1 e respetivos tempos de retenção.

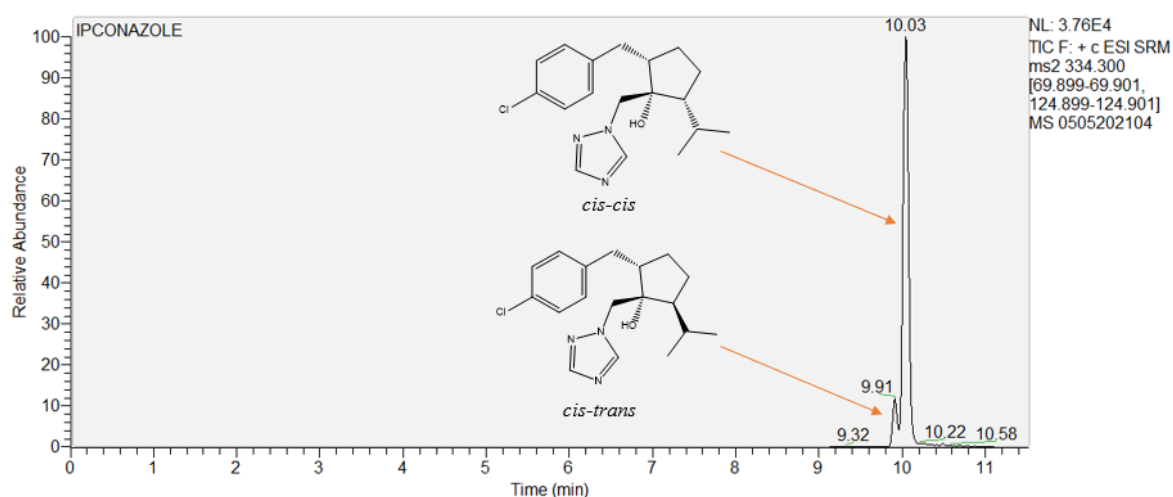


Por análise do cromatograma foi observado que o pesticida tebuconazol apresenta dois picos na janela de aquisição. A presença do segundo pico ( $t_r = 9,74$ ) pode ser explicada devido a uma interação com a primeira transição (MRM1) do composto procloraz, dado que, o íão precursor do tebuconazol e o íão produto do procloraz apresentam a mesma massa molecular. Essa interação pode ainda ser confirmada pelos tempos de retenção dos picos, como pode ser observado na figura 7.13.



**Figura 7.13:** Cromatogramas da solução padrão de trabalho P1 para os pesticidas tebuconazol e procloraz.

Ainda por análise do cromatograma observou-se que o pesticida ipconazol exibiu dois picos coeluídos. Este comportamento deve-se ao facto do ipconazol apresentar-se como uma mistura de diastereoisómeros, onde 90% corresponde ao composto *cis-cis* e 10% ao composto *cis-trans*, como mostra a figura 7.14. Uma vez que não é possível a completa separação dos compostos presentes na mistura, todos os resultados apresentados para o ipconazol nesse estudo devem ser considerados como a soma dos isómeros.



**Figura 7.14:** Cromatograma da solução padrão de trabalho P1 para o pesticida ipconazol.

Na tabela 7.5, estão discriminadas as equações das retas e os coeficientes de determinação obtidos, assim como a gama de trabalho para os 31 pesticidas em estudo.

**Tabela 7.5:** Gama de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação para os pesticidas por UPLC-MS/MS.

Pesticida	Gama de Linearidade (µg/L)	Número de pontos	Equação da Reta	Coefficiente de Determinação (R <sup>2</sup> )
Oxamil	2,5-25,1	7	y=107847,5936x + 539,9549	0,9999
Bentazona	1,9-15,1	6	y=122874,3553x + 83255,7881	0,9965
Desetilsimazina	2,5-25,0	7	y=15662,5883x + 514,3030	0,9999
Imidaclopride	2,5-25,2	7	y=28697,5884x - 6076,7608	0,9998
Dimetoato	2,6-25,5	7	y=199672,0990x - 25729,9605	0,9999
Cimoxanil	2,5-24,9	7	y=6218,0796x - 385,3648	0,9999
Desetilatrastina	2,5-25,1	7	y=98021,3470x - 45392,4770	0,9999
Carbendazima	2,5-25,3	7	y=167896,7256x - 44963,5492	0,9999
MCPA	2,5-25,3	7	y=30334,3051x - 4676,2885	0,9998
2,4 D	2,5-25,1	7	y=18017,8029x - 532,8766	0,9996
Triclopir	2,5-20,2	6	y=6227,4089x - 676,5491	0,9996
Carbofurão	2,5-25,1	7	y=186700,8305x - 6544,6508	0,9999
Desetilterbutilazina	2,5-25,1	7	y=179015,1088x - 52401,9362	0,9999
Clortolurão	2,5-25,2	7	y=88571,8858x - 29778,4635	0,9999
Isoproturão	2,5-25,1	7	y=81860,3210x - 4312,1569	0,9996
Diurão	2,5-25,2	7	y=11408,6011x + 557,9880	0,9999
Metidatião	2,5-25,0	7	y=15187,6552x + 94,8782	0,9999
Linurão	2,5-25,0	7	y=36184,2749x - 2792,8221	0,9998
Metiocarbe	2,5-25,3	7	y=48898,8092x - 9501,1363	0,9998
Propanil	2,5-25,1	7	y=10683,0660x - 1357,4844	0,9999
Pirimetanil	2,5-25,2	7	y=44893,1581x + 16471,3068	0,9998
Tetraconazole	2,5-24,7	7	y=86158,2114x - 36933,9189	0,9998
Dimoxistrobina	2,5-25,2	7	y=719216,0754x + 38277,6106	1,0000
Famoxadona	2,5-25,2	7	y=42323,6866x - 1858,4681	0,9998
Tebuconazol	2,5-25,3	7	y=39014,7435x - 18391,9720	0,9997
Penconazole	2,5-25,3	7	y=63352,9973x - 29340,5028	0,9997
Imazalil	2,5-25,3	7	y=118616,1120x - 51626,3920	0,9996
Metconazol	2,5-25,1	7	y=50718,3335x - 23769,4314	0,9999
Procloraz	2,5-25,3	7	y=198948,1002x - 70246,4743	0,9999
Ipconazole	2,5-25,2	7	y=58111,5110x - 24358,5500	1,0000
Oxadiazão	2,5-25,1	7	y=88148,5910x - 27015,0579	0,9999

Por análise da tabela é possível observar que os coeficientes de determinação obtidos para todos os compostos são superiores ao valor de aceitação interno ( $R^2 \geq 0,990$ ). Como já citado, a reta de calibração não garante por si só a existência da linearidade, pelo que, foram aplicados os testes estatísticos da análise de resíduos, áreas normalizadas, RIKILT e Mandel.

Na tabela 7.6, encontram-se resumidas as informações referentes à aplicação dos testes estatísticos discutidos para avaliação da linearidade.

**Tabela 7.6:** Resultados dos testes estatísticos para os pesticidas nos estudos de linearidade.

Pesticida	Número de pontos	Análise de Resíduos (+/-15%)	Teste Áreas Normalizadas (85-115%)	Teste RIKILT (90-110%)	Teste de Mandel (VT<F 0,05; 1; N-3)
Oxamil	7	[-2,5; 0,6]	[99,5; 102,5]	[98; 101]	7,185<7,71
Bentazona	6	[-14,3; 3,4]	[100,0; 115,4]	[91; 105]	493,273>10,13
Desetilsimazina	7	[-1,6; 1,6]	[98,0; 101,0]	[99; 102]	0,039<7,71
Imidaclopride	7	[-1,9; 1,9]	[99,0; 105,9]	[96; 103]	0,095<7,71
Dimetoato	7	[-6,0; 1,1]	[99,5; 111,1]	[91; 102]	5,631<7,71
Cimoxanil	7	[-2,8; 1,3]	[99,7; 105,3]	[96; 101]	0,027<7,71
Desetilatrastina	7	[-1,6; 6,3]	[99,9; 113,4]	[92; 105]	2,307<7,71
Carbendazima	7	[-1,6; 3,9]	[100,0; 106,8]	[96; 103]	0,512<7,71
MCPA	7	[-1,5; 1,5]	[99,3; 104,1]	[97; 102]	1,814<7,71
2,4 D	7	[-1,4; 1,8]	[99,1; 102,4]	[98; 102]	0,122<7,71
Triclopir	6	[-4,3; 2,3]	[98,6; 106,2]	[97; 103]	1,233<10,13
Carbofurão	7	[-4,4; 1,5]	[98,8; 105,9]	[95; 102]	5,013<7,71
Desetilterbutilazina	7	[-0,8; 1,1]	[100,0; 110,8]	[93; 103]	0,001<7,71
Clortolurão	7	[-1,9; 1,8]	[100,0; 112,1]	[92; 103]	0,630<7,71
Isoproturão	7	[-2,1; 1,5]	[99,6; 103,7]	[98; 102]	1,777<7,71
Diurão	7	[-0,7; 0,6]	[97,8; 100,7]	[99; 102]	0,874<7,71
Metidatião	7	[-1,2; 1,0]	[99,1; 101,2]	[99; 101]	0,884<7,71
Linurão	7	[-1,0; 1,1]	[99,4; 102,7]	[98; 101]	0,537<7,71
Metiocarbe	7	[-1,3; 5,3]	[97,6; 102,5]	[97; 102]	1,215<7,71
Propanil	7	[-1,4; 0,7]	[99,8; 106,4]	[95; 102]	0,101<7,71
Primetanil	7	[-1,6; 8,7]	[99,9; 107,3]	[96; 103]	2,307<7,71
Tetraconazole	7	[-2,2; 4,2]	[99,9; 113,9]	[92; 104]	2,309<7,71
Dimoxistrobina	7	[-4,1; 0,9]	[98,9; 102,9]	[98; 102]	7,087<7,71
Famoxadona	7	[-3,6; 1,7]	[99,0; 105,4]	[96; 102]	2,634<7,71
Tebuconazol	7	[-2,9; 12,2]	[98,9; 110,7]	[94; 105]	6,949<7,71
Penconazole	7	[-1,5; 7,0]	[99,3; 112,5]	[93; 105]	1,193<7,71
Imazalil	7	[-2,2; 3,7]	[95,2; 109,8]	[91; 105]	3,821<7,71
Metconazol	7	[-1,5; 4,0]	[100,0; 116,3]	[90; 105]	2,717<7,71
Procloraz	7	[-0,8; 1,2]	[99,3; 113,1]	[91; 104]	0,022<7,71
Ipconazole	7	[-0,8; 2,8]	[100,0; 114,9]	[91; 104]	3,477<7,71
Oxadiazão	7	[-1,1; 2,3]	[99,5; 109,9]	[94; 103]	0,547<7,71

Como se pode observar, o pesticida metconazol ultrapassa os critérios definidos para o teste das áreas normalizadas, pelo que, para este composto não podemos afirmar que o fator de resposta concentração vs área do pico seja proporcional. Desta forma, é necessário realizar uma reta de calibração diária para a análise em rotina. O pesticida bentazona não se encontra dentro dos critérios estabelecidos para o teste de Mandel e das áreas normalizadas, não apresentando assim um bom ajuste para uma calibração linear mesmo com sua gama de trabalho reduzida, pelo que se optou por recorrer a uma curva de calibração não linear (polinómio de 2º grau). Aplicou-se então, um teste de função de calibração não linear (anexo 8) de acordo com a norma (98).

Na tabela 7.7, encontram-se discriminados a equação do polinómio de grau 2, o coeficiente de determinação e a gama de trabalho para a bentazona. Encontra-se também o valor obtido para o teste de valor máximo e mínimo, que indica se a equação do polinómio de grau 2 pode ser utilizada para quantificar o composto, desde que o valor obtido pelo teste não se encontre dentro da gama de trabalho.

**Tabela 7.7:** Gama de trabalho, equação do polinómio de grau 2, coeficiente de determinação e valor do teste de máximo e mínimo para a bentazona.

Pesticida	Gama de Trabalho (µg/L)	Número de pontos	Equação do Polinómio de Grau 2	Coeficiente de Determinação (R <sup>2</sup> )	Teste de Valor Máximo e Mínimo (µg/L)	CV (%)
Bentazona	1,9-18,9	7	$y = -1845,6799x^2 + 154577,9279x - 13659,9563$	0,9999	41,88	0,31

Através da tabela 7.7, podemos assumir que a bentazona possui o comportamento de uma parábola com a concavidade voltada para baixo, sendo o melhor ajuste para o pesticida o uso de uma calibração não linear. A curva de calibração obedece ao requisito do valor máximo e mínimo e ao do coeficiente de variação, uma vez que, o valor obtido encontra-se fora dos valores da gama de trabalho e o coeficiente de variação é inferior a 2,5%, respetivamente.

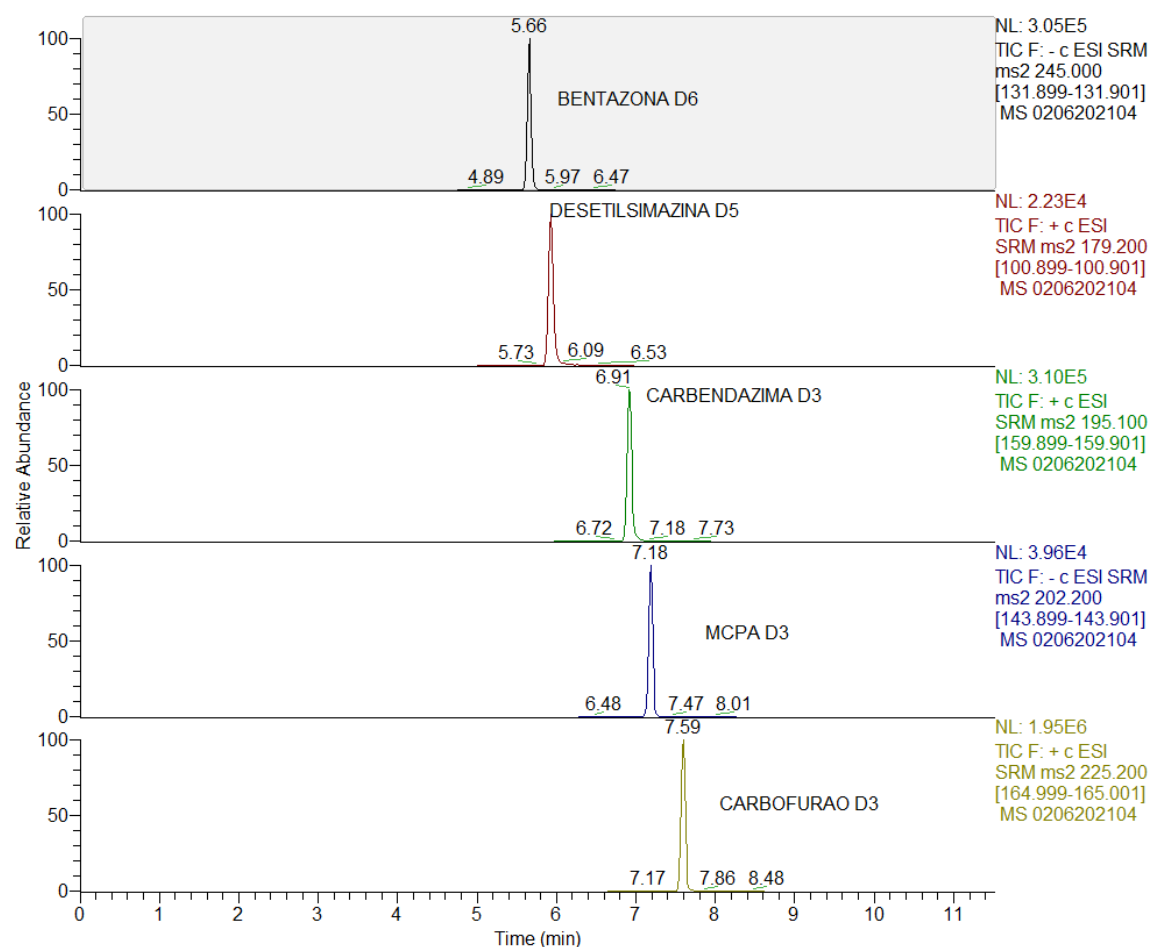
#### 7.2.2.2 Estudos de Linearidade com Padrões Internos Deuterados (“*Surrogate*”)

Quando o “*surrogate*” é adicionado em uma quantidade constante a todas as amostras, branco analítico e padrões de calibração em uma análise, a calibração envolve, então, a razão entre o sinal do analito e o sinal do “*surrogate*” como uma função da concentração do analito nos padrões. Dessa maneira, se os sinais do analito e do “*surrogate*” responderem proporcionalmente a flutuações aleatórias instrumentais e/ou de método, a proporção desses sinais será independente de tais flutuações. Ademais, se os dois sinais são influenciados da mesma maneira pelos efeitos da matriz, a compensação desses efeitos também ocorre.

Os estudos de linearidade dos padrões internos deuterados devem ser efetuados usando os mesmos testes estatísticos realizados na secção anterior.

As retas de calibração obtidas usam a razão sinal analito/sinal “*surrogate*” no eixo das ordenadas e a concentração do analito na amostra no eixo das abcissas, como indicado na figura 4.17 da secção 4.8.

Na figura 7.15, encontra-se o cromatograma e os tempos de retenção obtidos para os padrões “*surrogate*”.



**Figura 7.15:** Cromatograma obtido para os padrões “surrogate” por injeção das soluções padrão de trabalho e respectivos tempos de retenção.

Como referido na preparação das soluções padrão de trabalho para validação, descrita em 6.2.3.4.2, para cada ponto da curva de calibração foi adicionado uma quantidade constante da solução padrão intermédia dos “surrogate” (6.2.3.2.4), pelo que a mesma injeção realizada para a validação dos padrões de pesticidas pode ser usada para a validação da razão sinal analito/sinal “surrogate”. Na tabela 7.8, estão descritas as equações das retas e os coeficientes de determinação obtidos, assim como a gama de trabalho para a razão sinal analito/sinal “surrogate” em estudo.

Nota-se ainda, que o MCPA D3 foi utilizado como padrão “surrogate” para os analitos 2,4-D e triclopir, devido aos três compostos serem herbicidas ácidos, ionizáveis em modo negativo, e apresentarem comportamentos semelhantes de supressão e/ou enriquecimento iónico.

**Tabela 7.8:** Gama de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação para os pesticidas pelo método do padrão interno.

Analito/“Surrogate”	Gama de Linearidade (µg/L)	Número de pontos	Equação da Reta	Coeficiente de Determinação (R <sup>2</sup> )
Bentazona/Bentazona D6	1,9-18,9	7	y= 0,0926x – 0,002	0,9995
Desetilsimazina/Desetilsimazina D5	2,5-25,0	7	y=0,1496x – 0,0130	0,9999
MCPA/MCPA D3	2,5-25,3	7	y=0,1379x + 0,0250	0,9995
2,4-D/MCPA D3	2,5-25,1	6	y=0,0812 + 0,0178	0,9994
Triclopir/MCPA D3	2,5-25,3	6	y=0,0274 + 0,0035	0,9997
Carbofurão/Carbofurão D3	2,5-25,1	7	y=0,0278x – 0,0054	0,9999
Carbendazima /Carbendazima D3	2,5-25,3	7	y=0,0660x + 0,0015	0,9997

Como é possível observar, o uso da calibração com padrões internos deuterados cumprem o critério de aceitação interno para o coeficiente de determinação ( $R^2 \geq 0,990$ ). De seguida foram aplicados os testes estáticos da análise de resíduos, áreas normalizadas, RIKILT e Mandel. Os resultados obtidos para os testes estão apresentados na tabela 7.9.

**Tabela 7.9:** Estudos de linearidade dos pesticidas analisados por UPLC-MS/MS pelo método do padrão interno.

Analito/“Surrogate”	Número de pontos	Análise de Resíduos (+/-15%)	Teste Áreas Normalizadas (85-115%)	Teste RIKILT (90-110%)	Teste de Mandel (VT<F 0,05; 1; N-3)
Bentazona/Bentazona D6	7	[-5,1; 1,4]	[98,2; 105,8]	[95; 102]	10,997>7,71
Desetilsimazina /Desetilsimazina D5	7	[-1,6; 2,2]	[98,4; 104,3]	[97; 102]	-3,661<7,71
MCPA/MCPA D3	7	[-4,9; 3,3]	[95,6; 100,5]	[98; 103]	0,442<7,71
2,4-D/MCPA D3	6	[-4,4; 2,3]	[93,9; 100,6]	[97 – 104]	0,827<10,13
Triclopir/MCPA D3	6	[-2,7; 0,1]	[96,9 – 101,0]	[98 – 102]	-2,673<10,13
Carbofurão/Carbofurão D3	7	[-0,7; 0,6]	[92,7; 100,0]	[95; 102]	-3,771<7,71
Carbendazima/Carbendazima D3	7	[-1,1; 1,3]	[99,8; 102,0]	[99; 101]	2,018<7,71

Por análise da tabela 7.9, a única não conformidade encontra-se no valor do teste de Mandel para a razão bentazona/bentazona D6, demonstrando que a razão possui um melhor ajuste não linear à semelhança do comportamento do analito bentazona. Sendo assim, foi aplicado à razão bentazona/bentazona D6 o teste de função de calibração não linear.

Na tabela 7.10, encontram-se discriminados a equação do polinómio de grau 2, o coeficiente de determinação e a gama de trabalho para a razão analito/“surrogate”, bem como o valor obtido para o teste de valor máximo e mínimo.

Por análise da tabela, confirmamos que a razão apresenta o comportamento de uma parábola com concavidade voltada para baixo, e que o ajuste não linear pode ser assumido, dado que, o valor obtido para o teste de valor máximo e mínimo encontra-se fora do intervalo da gama de trabalho estudada e o coeficiente de variação é inferior a 2,5%.

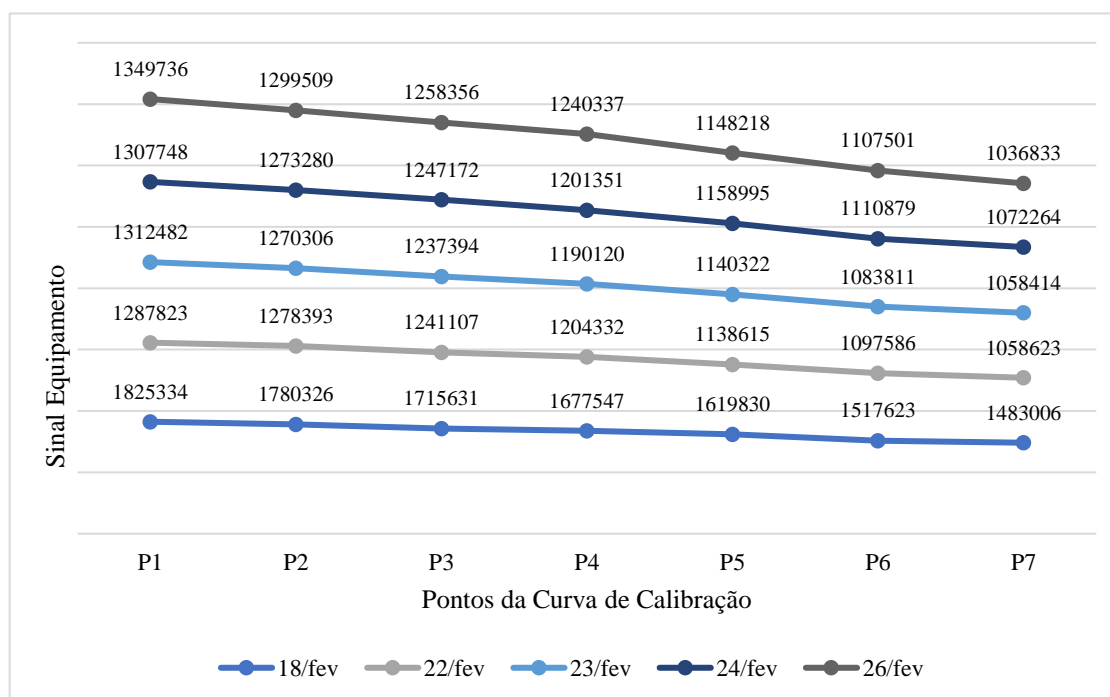
**Tabela 7.10:** Gama de trabalho, equação do polinômio de grau 2, coeficiente de determinação e valor do teste de máximo e mínimo para a razão bentazona/bentazona D6.

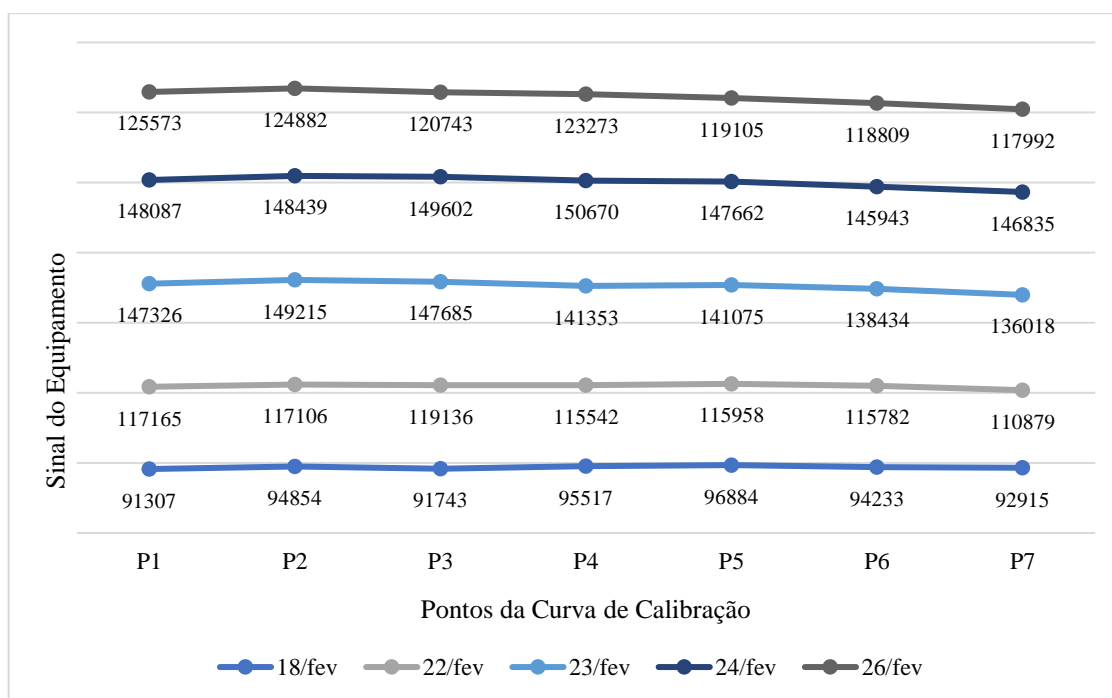
Analito/ “Surrogate”	Gama de Linearidad e (µg/L)	Númer o de pontos	Equação do Polinômio de Grau 2	Coeficiente de Determinaçã o (R <sup>2</sup> )	Teste de Valor Máximo e Mínimo (µg/L)	CV (%)
Bentazona/ Bentazona D6	1,9-18,9	7	$y = -0,000387x^2 + 0,10057793x - 0,030253217$	0,999	130,03	0,89

É perceptível que apesar de não se encontrar dentro dos critérios estabelecidos pelo teste de Mandel, a razão bentazona/bentazona D6 apresenta valores aceitáveis para todos os outros testes que configuram a existência de linearidade, o que pode ser explicado através da observação do comportamento da bentazona D6.

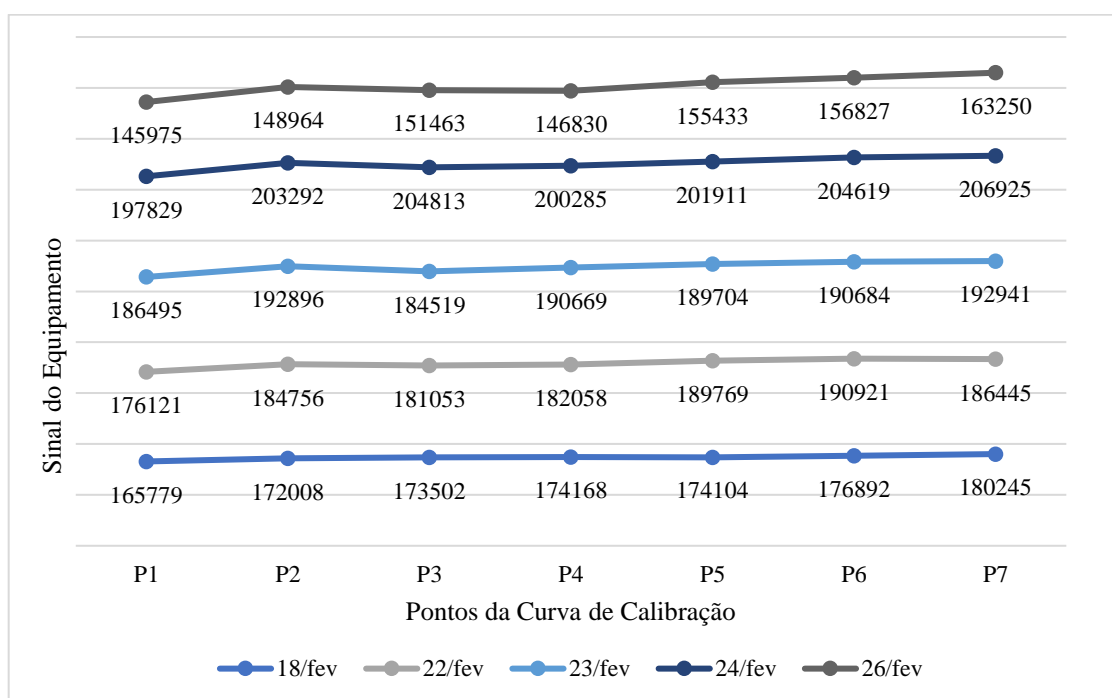
A figura 7.16 apresenta o comportamento da bentazona D6 ao longo de cinco dias de análises, onde é possível observar o decréscimo do sinal do padrão “surrogate”, face ao aumento da concentração da bentazona (analito) ao longo dos pontos da curva de calibração, levando à conclusão de que há uma competição entre esses compostos na fonte de ionização.

O mesmo comportamento não foi observado para os outros padrões “surrogate”, como pode ser constatado nas figuras 7.17, e 7.18 que apresentam o comportamento da desetilsimazina D5 e do MCPA D3, respetivamente, ao longo dos mesmos dias de análises.

**Figura 7.16:** Comportamento da bentazona D6 ao longo dos dias de análises.



**Figura 7.17:** Comportamento da desetilsmazina D5 ao longo dos dias de análises.



**Figura 7.18:** Comportamento do MCPA D3 ao longo dos dias de análises.

A tabela 7.10, apresenta o decréscimo médio dos padrões “*surrogate*” ao longos dos cinco dias de análises.



**Tabela 7.11:** Decréscimo médio dos padrões “*surrogate*” ao longos dos dias de análises.

<b>Padrão Surrogate</b>	<b>Decréscimo (%)</b>					<b>Média (%)</b>
	<b>18/fev</b>	<b>22/fev</b>	<b>23/fev</b>	<b>24/fev</b>	<b>26/fev</b>	
Bentazona D6	-18,8	-17,8	-19,4	-18,01	-23,2	<b>-18,8</b>
Desetilsimazina D5	1,8	-5,4	-7,7	-0,85	-6,0	<b>-5,4</b>
MCPA D3	8,7	5,9	3,5	4,60	11,8	<b>5,9</b>

O decréscimo superior da bentazona D6 em relação aos outros “*surrogate*” pode estar ligado ao facto da molécula apresentar três centros de ataque em sua estrutura, tornando-a uma molécula mais suscetível à ionização.

### 7.2.2.3 Estudos de Repetibilidade

A repetibilidade expressa a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas e é expressa em termos de coeficiente de variação. Os critérios de aceitação para os estudos de precisão devem sempre ser o mais baixo possível, tendo como valor máximo aceitável uma precisão de 25% (coeficiente de variação).

Pela análise da tabela 7.12, o método apresenta uma boa repetibilidade para os três níveis de concentração estudados.

Para o primeiro padrão da gama de trabalho a variabilidade dos ensaios de repetibilidade é maior do que as obtidas para o padrão intermédio e o padrão superior. Os valores dos coeficientes variam entre 0,70% (bentazona) e 7,54% (triclopir) para o primeiro padrão da gama de trabalho.

**Tabela 7.12:** Estudos de precisão instrumental do método de UPLC-MS/MS em condições de Repetibilidade (n=10).

Pesticidas	Concentração Inferior		Concentração Intermédia		Concentração Superior	
	Média (µg/L)	CV (%)	Média (µg/L)	CV (%)	Média (µg/L)	CV (%)
Oxamil	2,56	1,00	12,48	1,08	25,18	0,56
Bentazona	1,99	0,70	9,16	0,57	19,22	0,99
Desetilsimazina	2,59	2,57	12,14	2,35	25,43	1,92
Imidaclopride	2,69	2,01	12,38	1,22	25,69	1,08
Dimetoato	2,64	0,85	12,56	0,38	25,42	1,03
Cimoxanil	2,44	6,26	12,04	1,72	24,42	2,45
Desetilatrizona	2,68	2,00	12,28	1,10	25,56	1,00
Carbendazima	2,59	1,27	12,02	1,13	24,68	1,31
MCPA	2,34	2,47	12,13	1,47	25,07	1,49
2,4 D	2,44	3,85	12,18	1,82	25,08	1,95
Triclopir	2,65	7,54	12,30	2,04	25,46	1,86
Carbofurão	2,47	1,26	12,15	1,30	24,77	0,93
Desetilterbutilazina	2,59	1,58	12,23	1,02	25,32	0,40
Clortolurão	2,62	1,23	12,18	0,76	25,44	0,64
Isoprotrurão	2,54	1,09	11,86	0,94	24,36	0,57
Diurão	2,62	3,62	12,19	2,57	25,03	1,12
Metidatião	2,39	3,87	12,11	2,18	24,68	1,84
Linurão	2,65	1,51	12,22	1,08	25,19	0,98
Metiocarbe	2,66	2,65	12,14	1,78	24,69	1,22
Propanil	2,42	3,73	12,34	2,36	25,68	1,64
Primetanil	2,70	1,83	12,18	0,77	25,49	1,00
Tetraconazole	2,68	1,87	12,18	1,04	25,43	0,99
Dimoxistrobina	2,42	0,83	12,44	0,72	25,38	0,56
Famoxadona	2,73	2,40	12,28	1,21	25,10	1,23
Tebuconazol	2,67	1,98	12,02	1,77	25,06	1,06
Penconazole	2,76	1,34	12,25	0,90	25,60	0,79
Imazalil	2,78	1,80	12,11	1,91	24,85	1,08
Metconazol	2,74	1,12	12,09	0,99	25,26	0,74
Procloraz	2,64	0,79	12,37	0,84	25,43	0,98
Ipconazole	2,68	1,12	12,23	1,33	25,74	1,17
Oxadiazão	2,59	1,06	12,19	0,71	25,31	1,07

#### 7.2.2.4 Precisão Intermédia

A precisão intermédia foi avaliada pela injeção, em diferentes dias de calibração, de três padrões de diferentes concentrações equivalente, respetivamente, ao primeiro ponto, ao ponto intermédio e ao último ponto da gama de trabalho para cada composto.

A tabela 7.13 apresenta o coeficiente de variação para cada pesticida nos três níveis de concentrações estudados.

**Tabela 7.13:** Estudos de precisão intermédia do método de UPLC-MS/MS para análise de pesticidas (n=10).

Pesticidas	Concentração Inferior		Concentração Intermédia		Concentração Superior	
	Média (µg/L)	CV (%)	Média (µg/L)	CV (%)	Média (µg/L)	CV (%)
Oxamil	2,43	4,04	12,32	2,04	24,9	1,84
Bentazona	1,94	2,46	9,15	1,15	18,92	1,05
Desetilsimazina	2,64	4,68	12,03	2,3	24,94	2,25
Imidaclopride	2,68	2,88	12,16	1,88	25,17	1,31
Dimetoato	2,54	3,72	12,38	2,09	25,28	1,75
Cimoxanil	2,54	9,13	11,8	4,07	24,38	4,39
Desetilatrazina	2,62	4,7	12,12	2,11	25,12	1,73
Carbendazima	2,53	7,45	12,06	3,44	25,13	2,75
MCPA	2,53	5,43	12,29	2,15	25,24	2,44
2,4 D	2,47	4,9	12,35	2,66	25,1	2,74
Triclopir	2,53	8,06	12,36	3,24	25,17	3,21
Carbofurão	2,5	5,46	12,05	2,81	24,91	2,16
Desetilterbutilazina	2,55	3,8	12,07	1,99	24,97	1,74
Clortolurão	2,6	5,89	11,98	2,61	25	2,28
Isoproturão	2,53	4,67	11,86	3,15	24,72	3,61
Diurão	2,55	6,55	11,83	3,85	24,86	3,58
Metidatião	2,48	8,2	11,72	3,98	24,68	3,71
Linurão	2,58	4,21	11,93	2,28	24,82	2,09
Metiocarbe	2,58	6,9	11,86	3,99	24,98	3,84
Propanil	2,61	7,02	11,93	3,75	24,76	3,8
Pirimetanil	2,71	3,73	11,97	2,08	25,28	1,62
Tetraconazole	2,64	3,57	11,8	2,31	24,57	1,29
Dimoxistrobina	2,41	4,47	12,14	2,29	24,88	1,53
Famoxadona	2,66	6,18	11,81	4,03	24,66	2,93
Penconazole	2,72	4,13	11,94	2,77	25,15	2,33
Imazalil	2,74	3,71	12,04	2,13	25,08	1,71
Tebuconazol	2,52	8,62	12,11	3,65	24,73	2,85
Metconazol	2,72	3,16	11,83	2,59	24,97	2,27
Procloraz	2,64	3,8	12,05	2,38	24,92	1,56
Ipconazole	2,7	3,05	11,89	2,57	24,94	1,96
Oxadiazão	2,68	4,23	11,92	3,02	24,81	2,11

Os valores dos coeficientes de variação para as três concentrações avaliadas encontram-se abaixo de 10%. O CV é inferior a 10% para o primeiro nível de concentração, inferior a 4% para a concentração média e inferior a 3% para a concentração superior.

#### 7.2.2.5 Razão MRM1/MRM2

O espectrómetro de massa quando usado no modo SIM ou MRM, torna-se uma ferramenta essencial para a confirmação da identidade do composto a analisar como complemento do tempo de retenção característico de cada composto. Nestes casos, a monitorização dos analitos é efetuada através da seleção de duas transições MRM. A quantificação do analito é efetuada com recurso à transição que produz um sinal de maior intensidade (MRM1). A qualificação do analito é efetuada com base no quociente entre a transição MRM1 e MRM2.

Por este motivo é importante estudar a variação da razão MRM1/MRM2 ao longo da gama de trabalho definida de modo a garantir a estabilidade deste critério, como se encontra descrito na tabela 7.14.

**Tabela 7.14:** Variabilidade da razão MRM1/MRM2 ao longo da gama de trabalho para cada um dos compostos em estudo (n=10).

Pesticidas	Gama de Linearidade (µg/L)	Média da Razão MRM1/MRM2	Coefficiente de Variação (%)
Oxamil	2,5-25,1	1,95	0,90
Bentazona	1,9-18,9	1,32	0,49
Desetilsimazina	2,5-25,0	0,96	0,42
Imidaclopride	2,5-25,2	0,97	0,51
Dimetoato	2,6-25,5	1,80	0,33
Cimoxanil	2,5-24,9	3,01	3,02
Desetilatraxina	2,5-25,1	4,95	0,63
Carbendazima	2,5-25,3	5,30	0,91
MCPA	2,5-25,3	2,88	0,18
2,4 D	2,5-25,1	1,56	0,38
Triclopir	2,5-20,2	1,00	0,42
Carbofurão	2,5-25,1	1,22	0,93
Desetilterbutilazina	2,5-25,1	3,44	0,85
Clortolurão	2,5-25,2	2,85	0,77
Isoproturão	2,5-25,1	3,50	2,39
Diurão	2,5-25,2	3,19	2,27
Metidatião	2,5-25,0	3,04	2,35
Linurão	2,5-25,0	1,54	0,21
Metiocarbe	2,5-25,3	1,20	2,47
Propanil	2,5-25,1	3,20	1,79
Pirimetanil	2,5-25,2	1,11	1,17
Tetraconazole	2,5-24,7	3,37	1,16
Dimoxistrobina	2,5-25,2	1,79	0,70
Famoxadona	2,5-25,2	7,70	1,24
Tebuconazol	2,5-25,3	1,93	0,81
Penconazole	2,5-25,3	3,71	1,32
Imazalil	2,5-25,3	1,05	0,76
Metconazol	2,5-25,1	5,40	1,14
Procloraz	2,5-25,3	10,15	0,50
Ipconazole	2,5-25,2	5,66	0,64
Oxadiazão	2,5-25,1	1,26	1,31

Para todos os compostos a variabilidade da razão MRM1/MRM2 ao longo da gama de trabalho é inferior a 3%, o que permite a utilização deste valor como um critério de confirmação da presença de um determinado composto numa amostra.

#### 7.2.2.6 Limiares Analíticos Instrumentais

Os limiares analíticos instrumentais, limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram determinados com base na reta de calibração, em condições de repetibilidade e através da razão sinal/ruído. Na tabela 7.15, apresentam-se os limiares analíticos do método instrumental UPLC-ESI-MS/MS obtidos com base nas três metodologias citadas.

**Tabela 7.15:** Limiares analíticos instrumentais do método de UPLC-MS/MS para análise de pesticidas com base na reta de calibração, condições de repetibilidade e razão sinal/ruído.

Pesticida	1º Padrão da gama de trabalho (µg/L)	Reta de Calibração		Ensaio de Repetibilidade		Razão Sinal/Ruído	
		LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
Oxamil	2,5	0,32	1,06	0,08	0,26	0,001	0,004
Bentazona	1,9	0,27	0,91	0,04	0,14	0,001	0,004
Desetilsimazina	2,5	0,32	1,07	0,20	0,67	0,022	0,073
Imidaclopride	2,5	0,43	1,44	0,16	0,54	0,015	0,051
Dimetoato	2,6	0,40	1,34	0,07	0,22	0,004	0,012
Cimoxanil	2,5	0,29	0,98	0,46	1,53	0,046	0,154
Desetilatrastina	2,5	0,53	1,76	0,16	0,54	0,013	0,044
Carbendazima	2,5	0,46	1,53	0,30	1,01	0,007	0,025
MCPA	2,5	0,59	1,97	0,17	0,58	0,014	0,045
2,4 D	2,5	0,72	2,40	0,28	0,94	0,015	0,049
Triclopir	2,5	0,56	1,87	0,60	2,00	0,033	0,109
Carbofurão	2,5	0,20	0,66	0,71	2,37	0,004	0,013
Desetiltributylazina	2,5	0,26	0,85	0,12	0,41	0,006	0,020
Clortolurão	2,5	0,25	0,84	0,10	0,32	0,008	0,026
Isoproturão	2,5	0,33	1,09	0,08	0,28	0,005	0,017
Diurão	2,5	0,54	1,79	0,29	0,95	0,020	0,065
Metidatião	2,5	0,23	0,78	0,28	0,92	0,027	0,090
Linurão	2,5	0,43	1,43	0,12	0,40	0,012	0,040
Metiocarbe	2,5	0,70	2,32	0,21	0,70	0,009	0,029
Propanil	2,5	0,31	1,05	0,27	0,90	0,052	0,174
Pirimetanil	2,5	0,50	1,67	0,15	0,50	0,012	0,040
Tetraconazole	2,5	0,11	0,38	0,15	0,50	0,009	0,031
Dimoxistrobina	2,5	0,52	1,72	0,06	0,20	0,002	0,005
Famoxadona	2,5	0,51	1,71	0,20	0,65	0,013	0,045
Tebuconazol	2,5	0,33	1,10	0,16	0,53	0,006	0,021
Penconazole	2,5	0,41	1,38	0,11	0,37	0,009	0,028
Imazalil	2,5	0,71	2,38	0,15	0,50	0,005	0,016
Metconazol	2,5	0,54	1,81	0,09	0,31	0,009	0,030
Procloraz	2,5	0,35	1,17	0,06	0,21	0,003	0,010
Ipconazole	2,5	0,35	1,18	0,09	0,30	0,009	0,030
Oxadiazão	2,5	0,57	1,90	0,08	0,28	0,003	0,010

Os valores do LOQ determinados pelas metodologias abordadas, são inferiores à concentração do primeiro padrão da curva de calibração, o que permite concluir que a gama de linearidade se encontra bem ajustada.

Para todos os compostos, os limiares analíticos estimados através da razão sinal/ruído são significativamente inferiores do que os obtidos através dos outros dois métodos. Porém, o valor dos limites de quantificação para cada pesticida nas metodologias da reta de calibração e nos ensaios de repetibilidade são superiores ao valor paramétrico de  $0,1 \mu\text{g/L}^{-1}$  definidos no Decreto-Lei nº. 152/2017, o que confirma a necessidade de um método de preparação da amostra.

Deve-se também levar em consideração que para os nove pesticidas inseridos no método, apenas o tetraconazol, penconazol e imazalil apresentam valores iguais ou abaixo do critério de aceitação para o limite de detecção máximo aceitável definido pela lista de vigilância (17).

### 7.2.3 Validação do Método de Preparação da Amostra

A preparação da amostra permite, em teoria, melhorar os limiares analíticos do método. Estes são calculados levando em consideração o fator de concentração do método e a recuperação média global dos compostos. No entanto, devido aos fenômenos de supressão e enriquecimento iônico na fonte de ionização e as perdas que ocorrem nos processos de concentração da amostra, é certo que não é possível obter uma recuperação total (100%) dos analitos de interesse, sendo necessário o estudo da eficiência do processo extrativo em diferentes matrizes a fim de averiguar a percentagem dos analitos que é possível recuperar.

A percentagem de recuperação foi calculada com base na expressão 6-2.

$$\% \text{Recuperação} = \frac{C_{\text{exp}}}{C_{\text{teórica}}} \times 100 \quad (6-2)$$

Em que  $C_{\text{exp}}$  é a concentração do composto na amostra fortificada, determinada experimentalmente após o processo de extração e análise cromatográfica, e  $C_{\text{teórica}}$  a concentração teórica do pesticida na amostra fortificada, ajustada aos níveis de diluição.

#### 7.2.3.1 Precisão dos Ensaios de Recuperação em Diferentes Matrizes

Para avaliar a precisão do método extrativo, foram realizados 6 ensaios de recuperação dos pesticidas em quatro tipos de matrizes, como descrito em 6.2.6.1.1. Na tabela 7.16, apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios efetuados.

Para os pesticidas bentazona, desetilsimazina, MCPA, 2,4-D e triclopir, os resultados obtidos foram corrigidos pelos padrões “*surrogate*” adicionados, exibindo assim elevadas recuperações para tais compostos.

Considerando que os pesticidas MCPA, 2,4-D e triclopir possuem comportamentos semelhantes, o padrão “*surrogate*” MCPA D3 foi utilizado para corrigir as perdas no processo para os três pesticidas.

Por análise dos coeficientes de variação, verifica-se que o uso da SPE como método de preparação da amostra é satisfatório e apresenta uma boa precisão, uma vez que, os coeficientes de variação encontram-se abaixo do valor máximo aceitável de 25%.

**Tabela 7.16:** Precisão dos ensaios de recuperação para análise de pesticidas por SPE-UPLC-MS/MS em diferentes matrizes (n=6).

Pesticida	Nível de Fortificação (µg/L)	Água Ultra Pura		Água Consumo Humano		Captação Subterrânea		Captação Superficial	
		Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
Oxamil	0,03	71,7	18,1	74,0	5,0	54,6	3,5	83,3	1,3
Bentazona	0,03	115,1	0,7	119,3	1,2	97,3	0,8	114,0	0,6
Desetilsimazina	0,03	80,2	3,1	85,0	4,0	99,9	2,9	74,2	2,5
Imidaclopride	0,03	84,7	1,0	94,5	2,8	72,0	2,5	103,7	2,5
Dimetoato	0,03	58,0	7,7	60,7	2,5	54,8	1,2	65,3	0,9
Cimoxanil	0,03	73,5	5,2	68,3	3,0	58,8	4,1	68,6	5,7
Desetilatraxina	0,03	69,6	3,0	64,1	2,4	63,4	1,1	66,4	1,2
Carbendazima	0,03	71,2	2,7	88,3	5,8	73,8	4,5	83,0	1,3
MCPA	0,03	114,4	2,4	115,9	2,7	93,0	2,4	114,9	2,0
2,4-D	0,03	117,2	2,0	118,4	2,5	95,9	2,5	119,2	3,3
Triclopir	0,03	112,5	3,5	109,5	2,8	88,8	3,9	110,5	5,3
Carbofurão	0,03	56,5	10,3	53,3	3,8	39,1	1,7	61,5	4,3
Desetilterbutilazina	0,03	68,1	4,4	71,9	3,0	60,3	1,2	69,4	2,3
Clortolurão	0,03	75,1	5,7	66,2	2,9	66,8	0,3	66,9	0,6
Isoproturão	0,03	68,2	6,8	67,3	2,3	62,6	2,5	68,7	1,0
Diurão	0,03	77,9	0,9	69,8	2,4	70,0	4,2	72,7	3,2
Metidatião	0,03	64,6	9,5	66,8	4,7	57,3	3,7	70,2	4,2
Linurão	0,03	67,1	5,1	68,3	4,0	62,2	1,8	68,4	4,3
Metiocarbe	0,03	56,7	14,5	62,8	3,9	50,8	1,9	65,3	4,7
Propanil	0,03	80,1	1,3	74,6	2,6	68,3	4,6	77,0	1,6
Pirimetanil	0,03	54,1	5,6	68,5	4,1	49,8	3,3	64,1	9,6
Tetraconazole	0,029	80,4	1,8	79,7	2,8	71,6	3,3	78,9	4,5
Dimoxistrobina	0,03	75,8	1,3	71,3	2,6	68,1	3,2	73,9	4,5
Famoxadona	0,025	57,5	15,3	63,4	2,9	41,3	6,5	59,6	18,0
Tebuconazole	0,03	91,4	1,9	90,5	3,0	78,0	1,6	92,1	5,8
Penconazole	0,03	73,2	5,4	78,9	2,9	65,9	2,1	75,9	4,7
Imazalil	0,03	58,7	5,3	74,6	3,1	59,8	2,8	61,2	10,5
Metconazole	0,03	92,4	3,3	88,4	2,5	76,7	4,4	90,0	6,7
Procloraz	0,03	79,3	4,4	80,0	3,5	66,7	4,4	77,2	8,6
Ipconazole	0,03	90,0	6,8	85,9	3,0	72,1	3,3	86,1	12,4
Oxadiazão	0,03	57,6	4,5	63,3	3,8	49,5	2,1	59,4	12,1



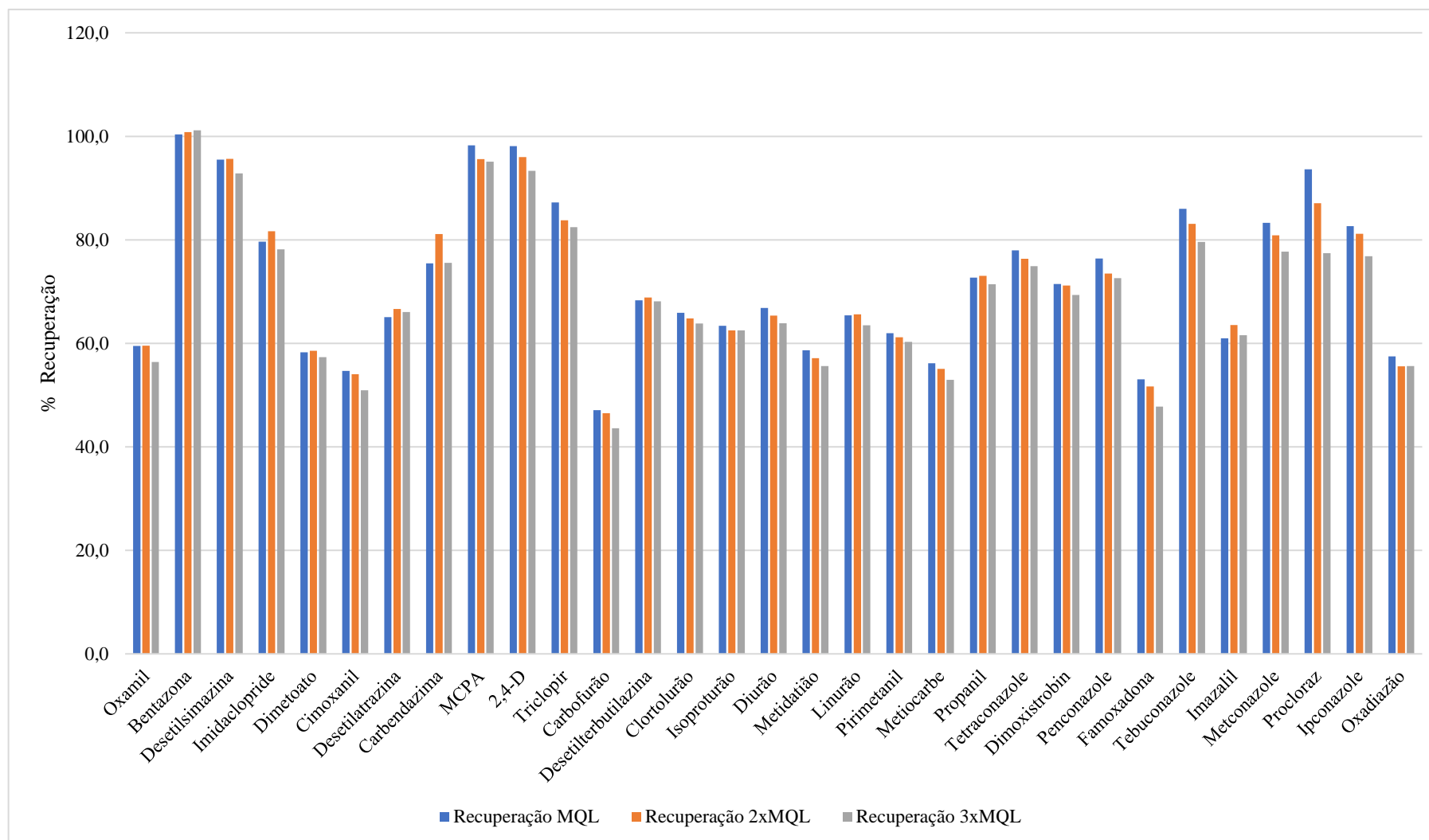
### 7.2.3.2 Efeito da Matriz em diferentes níveis de concentração

De maneira a avaliar a precisão do método e a resposta do equipamento, foram realizados ensaios de recuperação em três diferentes níveis de concentração, como descrito em 6.2.6.1.2.

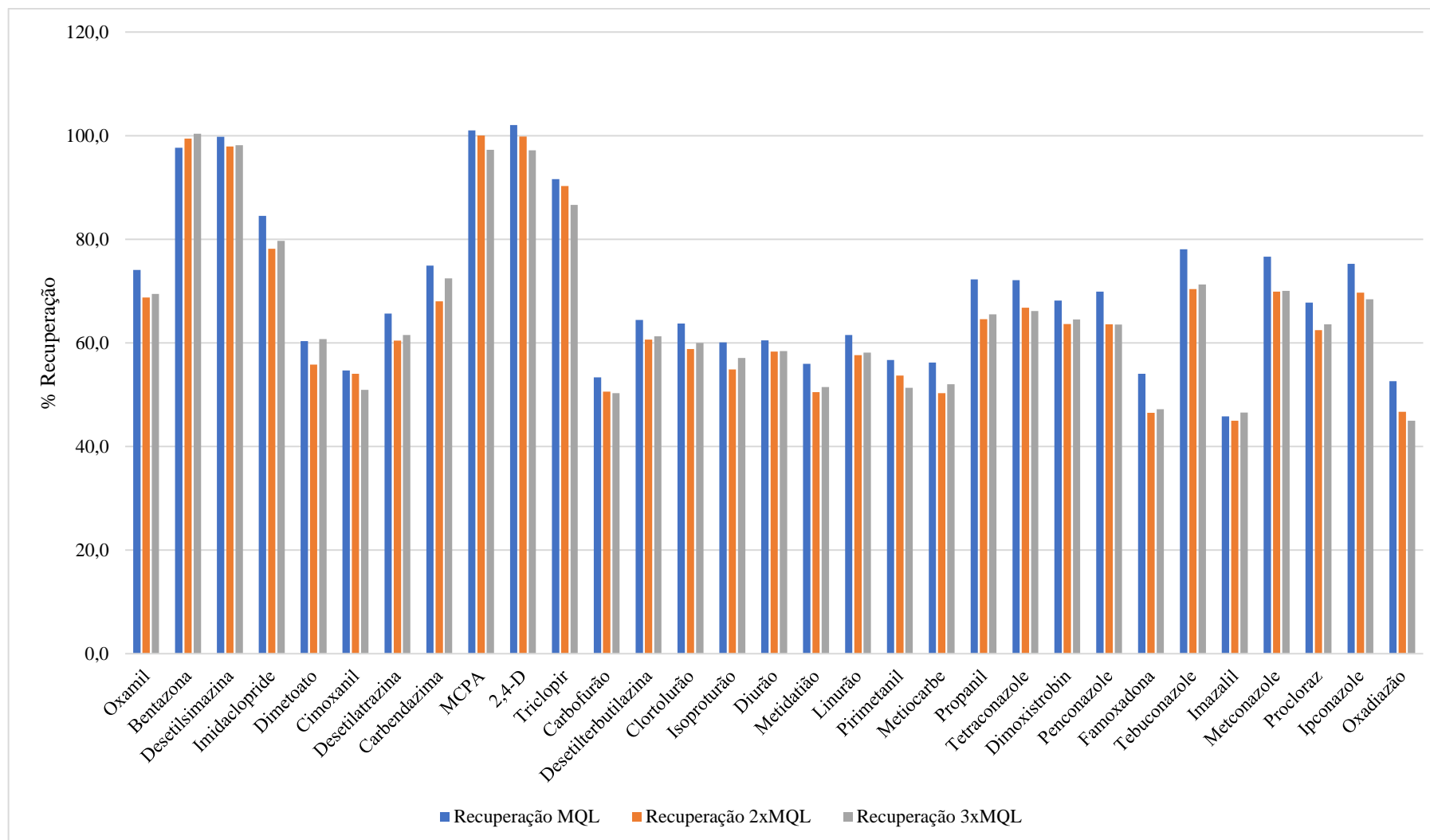
Nas figuras 7.19, 7.20 e 7.21 encontram-se as percentagens das recuperações médias obtidas em cada nível de concentração para cada tipo de matriz estudada, e a tabela 7.17, apresenta os resultados globais.

Por análise das figuras e dos coeficientes de variação global, é possível afirmar que não há grande variabilidade nas recuperações obtidas, tendo o equipamento uma resposta precisa face à variação das concentrações estudadas, o que leva a concluir que a presença de uma maior ou menor concentração do analito numa amostra não influencia a recuperação deste no processo de concentração.

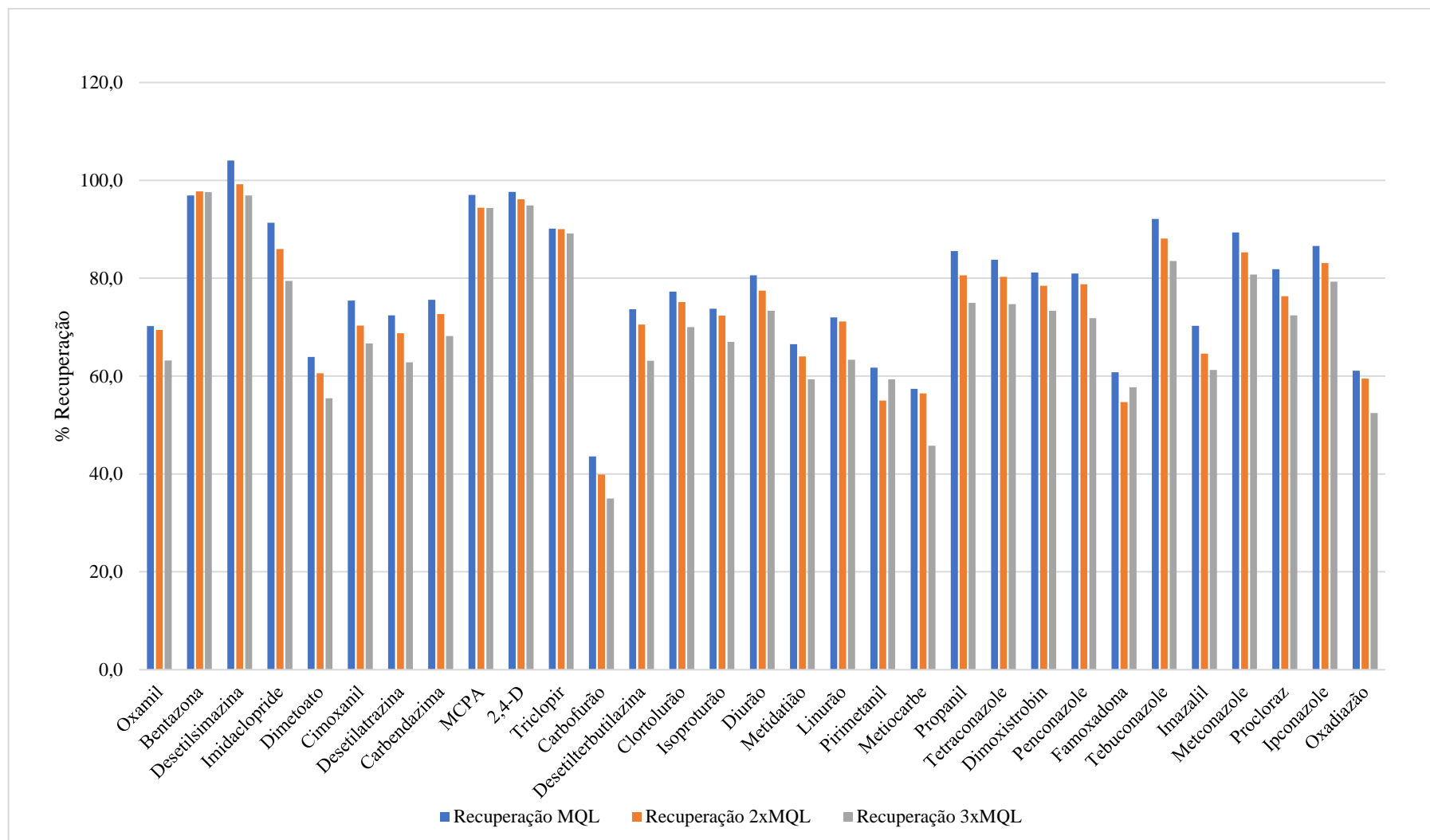
Os resultados da recuperação dos pesticidas, bentazona, desetilsimazina, MCPA, 2,4-D e triclopir, foram corrigidos pelos resultados obtidos na recuperação do respetivo “*surrogate*”.



**Figura 7.19:** Avaliação da recuperação relativa a diferentes níveis de concentração (FC 250×) – Água de Consumo Humano.



**Figura 7.20:** Avaliação da recuperação relativa a diferentes níveis de concentração (FC 250×) – Captação Superficial.



**Figura 7.21:** Avaliação da recuperação relativa a diferentes níveis de concentração (FC 250×) – Captação Subterrânea.

**Tabela 7.17:** Avaliação global da recuperação relativa a diferentes níveis de concentração (FC 250×) (n=4).

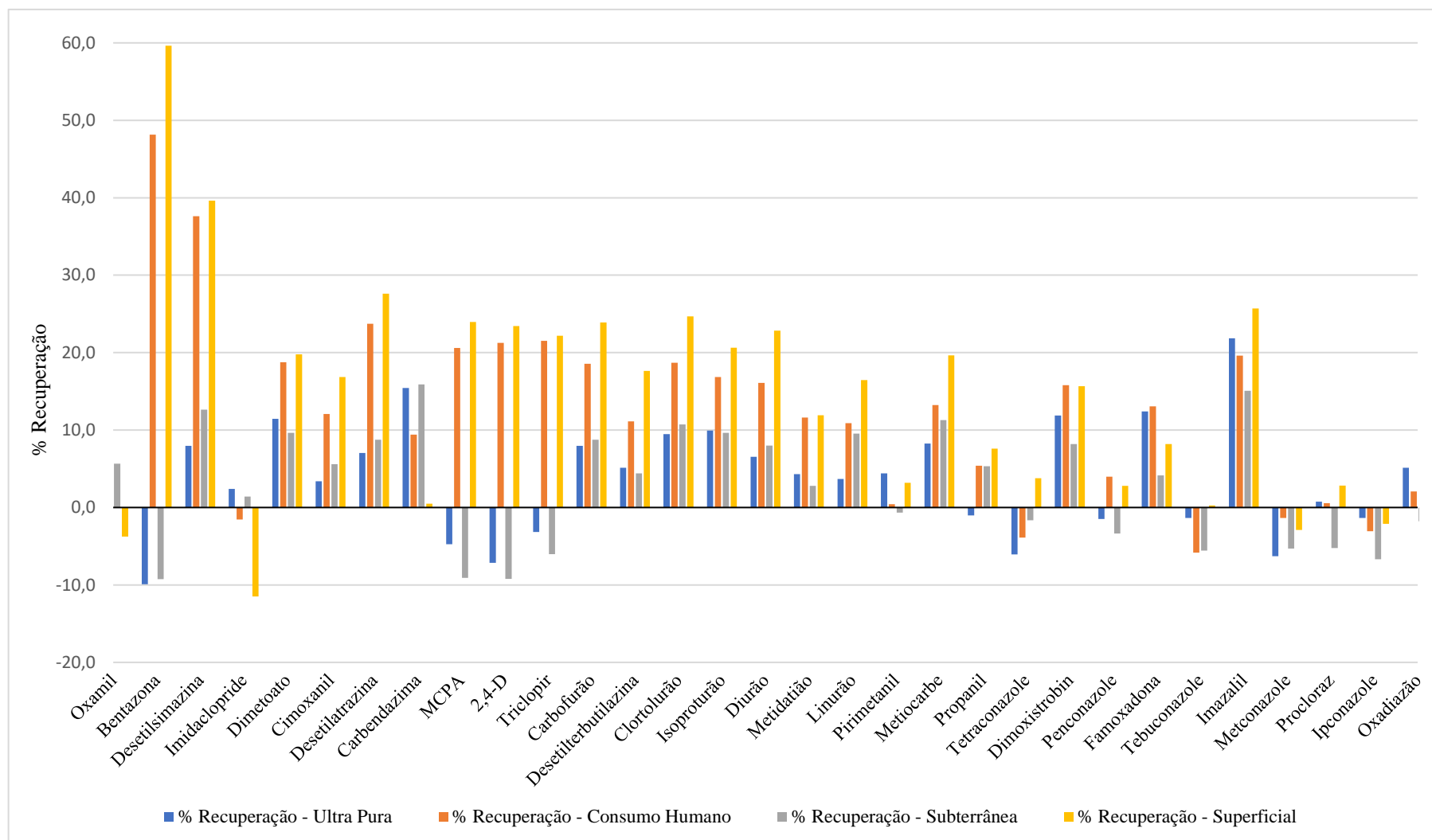
Pesticida	Água Consumo Humano			Captação Subterrânea			Captação Superficial		
	Média Global (%)	Desvio Padrão Global	CV Global (%)	Média Global (%)	Desvio Padrão Global	CV Global (%)	Média Global (%)	Desvio Padrão Global	CV Global (%)
Oxamil	58,5	2,6	4,4	68,6	3,7	5,4	71,8	3,7	5,2
Bentazona	100,8	1,6	1,6	97,1	0,8	0,8	99,3	1,4	1,4
Desetilsimazina	94,6	3,9	4,1	98,8	3,8	3,9	97,7	2,9	3,0
Imidaclopride	79,8	2,0	2,5	85,8	5,8	6,7	81,6	4,5	5,5
Dimetoato	58,1	1,5	2,6	60,5	4,0	6,7	59,3	3,0	5,1
Cimoxanil	53,2	2,1	3,9	71,3	4,7	6,6	53,5	2,1	3,9
Desetilatrastina	65,9	1,9	2,9	68,8	4,4	6,4	63,4	3,2	5,1
Carbendazima	77,4	3,9	5,1	72,7	4,0	5,5	71,6	5,5	7,7
MCPA	96,3	2,5	2,6	95,2	1,7	1,8	99,3	3,2	3,2
2,4-D	95,8	2,7	2,8	96,6	2,1	2,2	98,9	2,8	2,9
Triclopir	84,5	3,7	4,4	89,5	1,9	2,1	89,6	3,6	4,0
Carbofurão	45,7	2,5	5,4	39,8	3,8	9,6	52,0	2,6	5,1
Desetilterbutilazina	68,4	2,0	2,9	70,4	4,9	6,9	63,0	2,8	4,5
Clortolurão	64,9	1,5	2,4	75,1	4,0	5,3	61,6	3,2	5,2
Isoproturão	62,8	2,0	3,2	71,7	3,6	5,0	57,9	3,1	5,4
Diurão	65,4	2,2	3,4	78,0	4,0	5,2	59,9	2,5	4,2
Metidatião	57,1	2,2	3,8	63,5	3,4	5,3	53,5	3,5	6,6
Linurão	64,8	1,8	2,8	70,5	4,4	6,3	60,0	2,8	4,6
Metiocarbe	54,7	2,4	4,5	55,3	3,0	5,4	53,5	3,6	6,6
Propanil	72,4	1,8	2,4	80,6	5,3	6,6	67,6	5,1	7,5
Pirimetanil	61,1	1,9	3,0	57,9	3,7	6,4	54,9	3,8	6,9
Tetraconazole	76,4	3,1	4,0	80,4	4,2	5,3	68,3	3,5	5,2
Dimoxistrobina	70,7	1,8	2,5	78,9	4,1	5,2	66,1	3,0	4,6
Famoxadona	50,8	4,8	9,5	60,2	6,3	10,5	49,8	4,8	9,7
Tebuconazole	82,9	4,3	5,2	87,8	4,5	5,1	73,4	4,3	5,9
Penconazole	74,2	2,8	3,8	77,8	4,7	6,0	66,3	4,0	6,1
Imazalil	62,0	2,2	3,5	64,8	4,3	6,6	46,1	3,2	6,9
Metconazole	80,6	3,8	4,8	86,1	4,6	5,3	72,3	4,2	5,9
Procloraz	86,0	9,1	10,6	76,5	4,5	5,9	65,3	3,4	5,1
Ipconazole	80,2	4,4	5,5	84,0	3,6	4,3	71,2	4,3	6,0
Oxadiazão	56,2	2,3	4,0	58,8	4,6	7,9	47,3	3,9	8,3

### 7.2.3.3 Estudo do Efeito da Matriz na Fonte de Ionização

Uma das desvantagens do uso do *electrospray* como fonte de ionização está relacionada com a influência de outros compostos presentes na amostra que podem interferir no processo de ionização dos analitos, observando-se uma diminuição ou aumento de sinal. De forma a analisar quais os analitos mais suscetíveis à supressão ou enriquecimento iônico, foram realizados estudos em quatro tipos de matrizes, como descrito em 6.2.6.1.3, a fim de avaliar a percentagem de recuperação de cada pesticida após fortificação dos extratos com uma concentração conhecida. Na figura 7.22 está representada a percentagem de recuperação média obtida para cada pesticida em diferentes matrizes.

Considerando que a recuperação de 100% dos compostos de interesse configuram um cenário ideal, e consequente ausência do efeito da matriz na ionização, os resultados obtidos para as amostras das águas ultrapura e subterrânea demonstraram pouca influência da supressão ou enriquecimento iônico para os analitos analisados (cerca de 5%).

Para as amostras de águas de consumo humano e superficiais a supressão iônica é mais evidente, principalmente para os pesticidas bentazona (48% e 59%), desetilsimazina (38% e 39%), MCPA (20% e 23%), 2,4-D (20% e 22%) e triclopir (20% e 21%), o que justifica o uso do padrão “*surrogate*” para a correção das perdas existentes no processo.



**Figura 7.22:** Avaliação do efeito de matriz na fonte de ionização (FC 250×).

#### 7.2.3.4 Avaliação da Recuperação Absoluta e Relativa

A recuperação média global dos compostos em estudo foi calculada pela média das percentagens de recuperação obtidas para as águas de consumo humano, superficiais e subterrâneas, durante análises realizadas ao longo do estudo. A fim de minimizar as incertezas do método foi estipulado um critério de aceitação  $\leq 15\%$  para o coeficiente de variação (CV%). Para os ensaios de recuperação sem o padrão “*surrogate*” procedeu-se como descrito em 6.2.6.1.4.

A tabela 7.18 apresenta as percentagens da recuperação absoluta e do coeficiente de variação (CV%) obtidos para cada pesticida sem qualquer adição do padrão “*surrogate*”. Ainda na tabela 7.18 estão apresentadas as percentagens das recuperações médias para cada matriz estudada.

Por análise da tabela é possível identificar que os pesticidas bentazona, carbendazima, triclopir, carbofurão e famoxadona apresentam coeficientes de variação acima do critério de aceitação (15%). Os resultados obtidos para a bentazona e triclopir eram esperados, uma vez que, os mesmos sofrem forte supressão iónica na fonte de ionização. Entretanto, as recuperações médias das matrizes estudadas para os compostos carbendazima e carbofurão não apresentam homogeneidade entre si, o que justifica um maior coeficiente de variação para estes compostos. Nestes casos, optou-se pelo uso do padrão “*surrogate*” de maneira a minimizar as incertezas do método para os dois pesticidas.

Apesar da famoxadona apresentar um CV de 18,2%, não foram realizadas correções para a mesma, dado que, comercialmente não foi encontrado um padrão “*surrogate*” para o pesticida.

De maneira a avaliar a correção das perdas realizada pelo padrão “*surrogate*” aos pesticidas que necessitaram de sua adição, foram realizados ensaios de recuperação como descrito em 6.2.6.1.5. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 7.19.



**Tabela 7.18:** Percentagem da recuperação absoluta em diferentes matrizes (FC 250×) (n entre 288 e 337).

<b>Pesticidas</b>	<b>Recuperação Absoluta (%)</b>	<b>CV GLOBAL (%)</b>	<b>Recuperação média ÁGUA CONSUMO HUMANO (%)</b>	<b>Recuperação média ÁGUA SUBTERRÂNEA (%)</b>	<b>Recuperação média ÁGUA SUPERFICIAL (%)</b>
Oxamil	65	13,2	63	59	74
Bentazona	-	39,8	52	96	48
Desetilsimazina	-	10,0	62	62	61
Imidaclopride	85	10,8	84	78	92
Dimetoato	57	8,9	57	54	59
Cimoxanil	59	14,0	57	62	59
Desetilatrizona	63	8,2	63	63	62
Carbendazima	-	16,1	76	67	84
MCPA	-	14,1	65	78	68
2,4-D	-	14,9	65	80	70
Triclopir	-	16,1	60	75	64
Carbofurão	-	18,3	45	38	53
Desetilterbutilazina	65	8,3	66	62	65
Clortolurão	66	8,9	65	69	64
Isoproturão	63	7,5	64	64	62
Diurão	68	9,0	69	73	61
Metidatião	60	10,3	61	57	61
Linurão	64	7,7	65	62	63
Metiocarbe	56	11,0	58	50	59
Propanil	72	8,3	72	72	72
Pirimetanil	59	12,3	61	50	62
Tetraconazole	74	7,8	74	75	73
Dimoxistrobina	70	7,8	70	72	67
Famoxadona	51	18,1	51	48	55
Tebuconazole	83	8,2	84	83	83
Penconazole	71	8,1	72	69	72
Imazalil	58	12,5	59	60	54
Metconazole	80	8,7	80	80	78
Procloraz	71	10,6	73	70	69
Ipconazole	77	11,6	78	76	78
Oxadiazão	55	12,1	55	51	58

**Tabela 7.19:** Percentagem da recuperação relativa em diferentes matrizes (FC 250×) (n entre 67 e 328).

Pesticidas	Recuperação Relativa (%)	CV GLOBAL (%)	Recuperação média ÁGUA CONSUMO HUMANO (%)	Recuperação média ÁGUA SUBTERRÂNEA (%)	Recuperação média ÁGUA SUPERFICIAL (%)
Bentazona	100	6,4	100	97	102
Desetilsimazina	97	7,1	96	101	95
Carbendazima	86	12,2	84	87	93
MCPA	99	7,6	99	95	103
2,4-D	101	8,2	100	98	106
Triclopir	93	8,9	92	92	95
Carbofurão	92	6,3	89	93	94

Pelos resultados da tabela 7.19, podemos observar que todos os compostos apresentam homogeneidade em suas recuperações, diminuindo assim os valores do CV face aos valores apresentados na tabela 7.18 e cumprindo com o critério de aceitação estipulado ( $CV \leq 15\%$ ).

#### 7.2.3.5 Avaliação das Perdas do Processo de Preparação da Amostra

Durante os estudos de recuperação tornou-se evidente a perda dos analitos tanto no SPE, como na fonte de ionização. Contudo, a preparação da amostra engloba também a concentração do extrato obtido pelo SPE em um *turbovap*. De forma a realizar uma comparação e evidenciar a percentagem de cada analito perdido em cada etapa do processo de preparação, foram realizados três ensaios de recuperação em cada tipo de matriz (ultra-pura, consumo humano, superficial e subterrânea), para cada etapa de preparação da amostra.

Para a primeira etapa, realizou-se a fortificação dos extratos obtidos após a concentração no *turbovap*, evidenciando assim apenas as perdas ocorridas na fonte de ionização. Na segunda etapa o extrato obtido foi fortificado após a passagem pelo SPE e antes da concentração no *turbovap*, de forma a evidenciar as perdas ocorridas no processo de evaporação. Por fim, a terceira etapa englobou todo o processo, tendo sido a amostra fortificada antes da passagem pelo SPE.

Uma comparação das perdas em cada etapa, para cada tipo de matriz, pode ser observada nas tabelas 7.20, 7.21, 7.22 e 7.23, pelas quais é possível afirmar que para a maioria dos compostos sempre existem perdas de uma etapa para outra.

No pior cenário, podemos citar o carbofurão, que apresenta até 87% de perdas, no total, para a matriz de captação subterrânea. Contudo, a maior percentagem das perdas desse pesticida advém das etapas de concentração e extração para qualquer matriz analisada. Este comportamento concede

ao carbofurão a menor recuperação média global do método de ensaio (45,1%), quando não há a correção das perdas pelo uso do padrão “*surrogate*”.

Para o melhor cenário podemos citar o pesticida imidaclopride, que apresenta perdas totais inferiores a 17% para qualquer tipo de matriz.

**Tabela 7.20:** Comparação da percentagem de recuperação nas etapas de preparação da amostra – Água Ultra Pura.

<b>Pesticida</b>	<b>Recuperação Média (%) Extrato fortificado ao LOQ após a Concentração <u>FONTE DE IONIZAÇÃO</u></b>	<b>Recuperação Média (%) Extrato fortificado ao LOQ <u>antes</u> da Concentração <u>TURBOVAP</u></b>	<b>Perdas dos Analitos no Processo de Concentração (%)</b>	<b>Recuperação Média (%) Amostra fortificada ao LOQ antes da extração <u>SPE</u></b>	<b>Perdas dos Analitos no Processo de extração (%)</b>	<b>Perda Total do Método de Preparação da amostra (%)</b>
Oxamil	95,4	89,0	-6,7	80,5	-9,5	-16,3
Bentazona	109,9	111,3	1,3	77,0	-30,8	-29,5
Desetilsimazina	92,0	74,3	-19,2	61,5	-17,3	-36,5
Imidaclopride	97,6	91,0	-6,8	81,9	-9,9	-16,7
Dimetoato	88,5	67,0	-24,4	48,1	-28,1	-52,5
Cimoxanil	96,6	62,1	-35,8	47,3	-23,7	-59,5
Desetilatrastina	93,0	69,9	-24,8	60,1	-14,1	-38,9
Carbendazima	84,6	69,6	-17,7	60,6	-12,8	-30,6
MCPA	104,7	109,3	4,4	73,3	-33,0	-28,6
2,4-D	107,2	112,3	4,7	69,7	-38,0	-33,2
Triclopir	103,1	99,8	-3,2	61,0	-38,9	-42,1
Carbofurão	92,1	63,3	-31,2	33,1	-47,7	-78,9
Desetilterbutilazina	94,9	70,1	-26,1	55,1	-21,4	-47,5
Clortolurão	90,5	78,9	-12,8	74,1	-6,1	-18,9
Isoproturão	90,0	72,6	-19,4	67,7	-6,7	-26,1
Diurão	93,4	79,3	-15,1	77,8	-2,0	-17,1
Metidatião	95,7	64,5	-32,6	51,1	-20,8	-53,4
Linurão	96,3	70,7	-26,6	60,9	-14,0	-40,5
Metiocarbe	91,7	64,3	-29,9	51,0	-20,8	-50,7
Propanil	101,0	83,5	-17,3	79,8	-4,4	-21,8
Pirimetanil	95,6	63,4	-33,7	41,1	-35,2	-68,9
Tetraconazole	106,1	82,7	-22,0	74,7	-9,7	-31,7
Dimoxistrobin	88,1	80,7	-8,4	70,0	-13,2	-21,6
Famoxadona	87,6	52,0	-40,7	40,6	-22,0	-62,6
Tebuconazole	101,4	94,1	-7,2	81,4	-13,4	-20,6
Penconazole	101,5	81,5	-19,7	69,5	-14,7	-34,4
Imazalil	78,1	57,9	-25,8	45,6	-21,3	-47,2
Metconazole	106,3	89,8	-15,6	75,8	-15,6	-31,1
Procloraz	99,2	81,1	-18,3	65,5	-19,2	-37,5
Ipconazole	101,4	84,0	-17,1	70,9	-15,6	-32,7
Oxadiazão	94,9	62,0	-34,6	48,9	-21,3	-55,9

**Tabela 7.21:** Comparação da percentagem de recuperação nas etapas de preparação da amostra – Água Consumo Humano.

<b>Pesticida</b>	<b>Recuperação Média (%) Extrato fortificado ao LOQ após a Concentração <u>FONTE DE IONIZAÇÃO</u></b>	<b>Recuperação Média (%) Extrato fortificado ao LOQ antes da Concentração <u>TURBOVAP</u></b>	<b>Perdas dos Analitos no Processo de Concentração (%)</b>	<b>Recuperação Média (%) Amostra fortificada ao LOQ antes da extração <u>SPE</u></b>	<b>Perdas dos Analitos no Processo de extração (%)</b>	<b>Perda Total do Método de Preparação da amostra (%)</b>
Oxamil	88,2	90,2	2,2	81,1	-10,1	-7,9
Bentazona	51,8	42,4	-18,3	40,4	-4,6	-22,9
Desetilsimazina	62,4	47,7	-23,5	43,4	-9,0	-32,6
Imidaclopride	101,5	91,5	-9,9	87,2	-4,7	-14,6
Dimetoato	81,2	66,1	-18,6	56,8	-14,0	-32,6
Cimoxanil	87,9	68,7	-21,8	66,3	-3,6	-25,4
Desetilatrastina	76,3	59,5	-22,0	55,5	-6,7	-28,8
Carbendazima	90,6	73,8	-18,5	64,1	-13,1	-31,6
MCPA	79,4	64,2	-19,2	61,9	-3,6	-22,8
2,4-D	78,7	62,2	-21,0	61,7	-0,9	-21,9
Triclopir	78,5	59,3	-24,5	56,3	-5,1	-29,5
Carbofurão	81,4	60,8	-25,4	42,4	-30,3	-55,6
Desetilterbutilazina	88,9	70,9	-20,2	61,9	-12,8	-33,0
Clortolurão	81,3	73,7	-9,4	69,1	-6,2	-15,5
Isoproturão	83,1	72,5	-12,8	67,8	-6,5	-19,3
Diurão	83,9	74,6	-11,1	71,9	-3,7	-14,7
Metidatião	88,4	71,7	-18,9	63,2	-11,8	-30,7
Linurão	89,1	78,8	-11,5	70,2	-10,9	-22,5
Metiocarbe	86,8	71,5	-17,6	63,1	-11,8	-29,4
Propanil	94,6	88,5	-6,5	82,7	-6,6	-13,1
Pirimetanil	99,6	75,9	-23,8	65,6	-13,5	-37,3
Tetraconazole	103,9	92,8	-10,7	80,6	-13,2	-23,8
Dimoxistrobina	84,2	85,7	1,7	74,6	-13,0	-11,2
Famoxadona	86,9	63,9	-26,5	51,8	-18,8	-45,4
Tebuconazole	105,8	98,4	-7,0	89,5	-9,1	-16,1
Penconazole	96,0	89,9	-6,4	78,0	-13,3	-19,6
Imazalil	80,4	69,8	-13,2	60,6	-13,2	-26,3
Metconazole	101,4	99,8	-1,5	84,8	-15,0	-16,6
Procloraz	99,4	95,4	-4,0	79,9	-16,3	-20,3
Ipconazole	103,1	101,8	-1,3	87,9	-13,6	-14,9
Oxadiazão	97,9	75,5	-22,9	63,0	-16,6	-39,5

**Tabela 7.22:** Comparação da percentagem de recuperação nas etapas de preparação da amostra – Captação Subterrânea.

<b>Pesticida</b>	<b>Recuperação Média (%) Extrato fortificado ao LOQ após a Concentração FONTE DE IONIZAÇÃO</b>	<b>Recuperação Média (%) Extrato fortificado ao LOQ antes da Concentração TURBOVAP</b>	<b>Perdas dos Analitos no Processo de Concentração (%)</b>	<b>Recuperação Média (%) Amostra fortificada ao LOQ antes da extração SPE</b>	<b>Perdas dos Analitos no Processo de extração (%)</b>	<b>Perda Total do Método de Preparação da amostra (%)</b>
Oxamil	94,3	92,6	-1,8	58,6	-36,7	-38,6
Bentazona	109,3	119,8	9,6	94,6	-21,0	-11,4
Desetilsimazina	87,3	77,5	-11,2	54,3	-29,9	-41,1
Imidaclopride	98,6	99,1	0,6	82,0	-17,3	-16,8
Dimetoato	90,3	65,9	-27,1	50,7	-23,0	-50,1
Cimoxanil	94,4	70,6	-25,2	59,8	-15,3	-40,5
Desetilatrastina	91,3	59,4	-34,9	56,8	-4,3	-39,2
Carbendazima	84,1	91,8	9,2	57,2	-37,7	-28,5
MCPA	109,1	122,9	12,6	97,0	-21,0	-8,4
2,4-D	109,2	126,8	16,1	99,5	-21,6	-5,5
Triclopir	106,0	115,2	8,6	82,8	-28,1	-19,5
Carbofurão	91,2	67,3	-26,2	26,1	-61,2	-87,4
Desetilterbutilazina	95,6	69,1	-27,7	54,8	-20,8	-48,5
Clortolurão	89,3	72,1	-19,2	69,5	-3,7	-22,9
Isoproturão	90,4	66,3	-26,6	61,7	-7,0	-33,6
Diurão	92,0	70,2	-23,7	71,5	1,9	-21,8
Metidatião	97,2	64,8	-33,3	50,8	-21,7	-55,0
Linurão	90,5	68,6	-24,2	62,1	-9,3	-33,6
Metiocarbe	88,7	62,5	-29,6	44,3	-29,1	-58,6
Propanil	94,7	81,1	-14,4	74,9	-7,6	-21,9
Pirimetanil	100,7	69,4	-31,0	48,6	-30,0	-61,1
Tetraconazole	101,6	76,8	-24,5	72,8	-5,1	-29,6
Dimoxistrobina	91,8	72,6	-20,9	70,2	-3,4	-24,3
Famoxadona	95,9	47,0	-51,0	37,7	-19,8	-70,8
Tebuconazole	105,6	89,0	-15,7	80,2	-9,9	-25,6
Penconazole	103,4	77,7	-24,9	68,4	-11,9	-36,8
Imazalil	84,9	51,2	-39,7	52,0	1,6	-38,1
Metconazole	105,3	83,0	-21,2	75,9	-8,5	-29,7
Procloraz	105,2	72,6	-31,0	67,2	-7,5	-38,5
Ipconazole	106,7	78,8	-26,1	72,1	-8,5	-34,6
Oxadiazão	101,8	59,9	-41,2	49,5	-17,4	-58,5

**Tabela 7.23:** Comparação da percentagem de recuperação nas etapas de preparação da amostra – Captação Superficial.

<b>Pesticida</b>	<b>Recuperação Média (%) Extrato fortificado ao LOQ após a Concentração FONTE DE IONIZAÇÃO</b>	<b>Recuperação Média (%) Extrato fortificado ao LOQ antes da Concentração TURBOVAP</b>	<b>Perdas dos Analitos no Processo de Concentração (%)</b>	<b>Recuperação Média (%) Amostra fortificada ao LOQ antes da extração SPE</b>	<b>Perdas dos Analitos no Processo de extração (%)</b>	<b>Perda Total do Método de Preparação da amostra (%)</b>
Oxamil	103,7	92,3	-11,1	81,4	-11,7	-22,8
Bentazona	40,4	51,9	28,6	48,3	-7,0	21,7
Desetilsimazina	60,4	50,4	-16,6	47,1	-6,4	-23,0
Imidaclopride	111,5	101,3	-9,2	98,7	-2,6	-11,7
Dimetoato	80,2	71,6	-10,7	59,6	-16,8	-27,5
Cimoxanil	83,2	88,4	6,3	56,2	-36,4	-30,1
Desetilatrastina	72,4	74,7	3,2	56,9	-23,8	-20,6
Carbendazima	99,5	80,6	-19,0	75,0	-7,0	-26,0
MCPA	76,1	69,6	-8,5	72,5	4,2	-4,3
2,4-D	76,6	71,2	-7,1	75,4	6,0	-1,1
Triclopir	77,8	63,9	-17,8	65,0	1,7	-16,2
Carbofurão	76,1	57,4	-24,5	38,7	-32,6	-57,1
Desetilterbutilazina	82,4	76,8	-6,7	63,9	-16,8	-23,5
Clortolurão	75,3	83,8	11,2	69,5	-17,1	-5,8
Isoproturão	79,4	76,9	-3,2	65,0	-15,4	-18,5
Diurão	77,1	89,4	15,9	69,0	-22,8	-6,9
Metidatião	88,1	70,9	-19,4	59,6	-16,0	-35,4
Linurão	83,5	81,3	-2,6	65,4	-19,6	-22,2
Metiocarbe	80,3	73,6	-8,4	55,9	-24,0	-32,4
Propanil	92,4	92,0	-0,5	80,7	-12,3	-12,7
Pirimetanil	96,8	71,7	-25,9	68,4	-4,6	-30,5
Tetraconazole	96,2	94,7	-1,6	75,4	-20,3	-21,9
Dimoxistrobina	84,3	90,9	7,8	69,1	-23,9	-16,2
Famoxadona	91,8	61,2	-33,3	44,9	-26,6	-59,9
Tebuconazole	99,7	103,2	3,4	87,3	-15,4	-12,0
Penconazole	97,2	91,1	-6,2	75,2	-17,5	-23,7
Imazalil	74,3	72,6	-2,3	55,7	-23,3	-25,6
Metconazole	102,9	102,2	-0,7	81,5	-20,3	-21,0
Procloraz	97,2	94,0	-3,3	73,7	-21,6	-24,9
Ipconazole	102,1	98,4	-3,7	80,7	-17,9	-21,6
Oxadiazão	96,1	76,0	-20,9	58,6	-22,9	-43,9

### 7.2.4 Limiares Analíticos do Método Global

Após determinada a recuperação média global para cada pesticida em estudo, foi possível calcular os limiares analíticos do método global com base na reta de calibração, em condições de repetibilidade e através da razão sinal/ruído. Na tabela 7.24, apresentam-se os limiares analíticos do método global calculados conforme descrito em 6.2.7. Os valores da recuperação média para o cálculo dos MDLs e MQLs são os definidos na tabela 7.18. Para estes dos pesticidas os valores de recuperação são os definidos na tabela 7.19.

**Tabela 7.24:** Limiares analíticos do método global obtidos com base na reta de calibração, condições de repetibilidade e razão sinal/ruído.

Pesticida	Reta de Calibração		Ensaio de Repetibilidade (n=10)		Razão Sinal/Ruído	
	MDL (µg/L)	MQL (µg/L)	MDL (µg/L)	MQL (µg/L)	MDL (µg/L)	MQL (µg/L)
Oxamil	0,0020	0,0065	0,0005	0,0016	7,7E-06	2,6E-05
Bentazona	0,0011	0,0036	0,0002	0,0006	4,7E-06	1,6E-05
Desetilsimazina	0,0013	0,0044	0,0008	0,0027	9,0E-05	3,0E-04
Imidaclopride	0,0020	0,0068	0,0008	0,0025	7,2E-05	2,4E-04
Dimetoato	0,0028	0,0094	0,0005	0,0016	2,5E-05	8,5E-05
Cimoxanil	0,0020	0,0066	0,0031	0,0103	3,1E-04	1,0E-03
Desetilatrizona	0,0034	0,0112	0,0010	0,0034	8,5E-05	2,8E-04
Carbendazima	0,0021	0,0071	0,0014	0,0047	3,4E-05	1,1E-04
MCPA	0,0024	0,0080	0,0007	0,0023	5,5E-05	1,8E-04
2,4 D	0,0028	0,0094	0,0011	0,0037	5,7E-05	1,9E-04
Triclopir	0,0024	0,0080	0,0026	0,0086	1,4E-04	4,7E-04
Carbofurão	0,0009	0,0029	0,0031	0,0103	1,7E-05	5,6E-05
Desetilterbutilazina	0,0016	0,0053	0,0008	0,0025	3,6E-05	1,2E-04
Clortolurão	0,0015	0,0051	0,0006	0,0019	4,8E-05	1,6E-04
Isoproturão	0,0021	0,0069	0,0005	0,0018	3,3E-05	1,1E-04
Diurão	0,0032	0,0106	0,0017	0,0056	1,1E-04	3,8E-04
Metidatião	0,0016	0,0052	0,0018	0,0062	1,8E-04	6,0E-04
Linurão	0,0027	0,0089	0,0008	0,0025	7,5E-05	2,5E-04
Metiocarbe	0,0050	0,0166	0,0015	0,0050	6,1E-05	2,0E-04
Propanil	0,0017	0,0058	0,0015	0,0050	2,9E-04	9,7E-04
Primetanil	0,0034	0,0113	0,0010	0,0034	8,1E-05	2,7E-04
Tetraconazole	0,0006	0,0020	0,0008	0,0027	5,1E-05	1,7E-04
Dimoxistrobina	0,0029	0,0098	0,0003	0,0011	9,0E-06	3,0E-05
Famoxadona	0,0040	0,0134	0,0015	0,0051	1,1E-04	3,5E-04
Penconazole	0,0020	0,0067	0,0005	0,0018	4,1E-05	1,4E-04
Imazalil	0,0040	0,0134	0,0008	0,0028	2,8E-05	9,2E-05
Tebuconazol	0,0023	0,0076	0,0011	0,0037	4,4E-05	1,5E-04
Metconazol	0,0027	0,0090	0,0005	0,0015	4,6E-05	1,5E-04
Procloraz	0,0020	0,0066	0,0004	0,0012	1,7E-05	5,5E-05
Ipconazole	0,0018	0,0061	0,0005	0,0016	4,6E-05	1,5E-04
Oxadiazão	0,0041	0,0138	0,0006	0,0020	2,1E-05	7,1E-05

Sabe-se que o Decreto-Lei nº. 152/2017, exige limites de  $0,1 \mu\text{g/L}^{-1}$  para a quantificação individual de pesticidas, porém, ainda segundo o decreto, as características de desempenho dos métodos utilizados devem, no mínimo, ser capazes de medir concentrações iguais ao valor



paramétrico com um limite de quantificação, conforme definido no n.º 2 do artigo 2.º da Diretiva 2009/90/CE da Comissão, igual ou inferior a 30 % do valor paramétrico pertinente.

Neste caso, o método de ensaio validado neste estudo deve apresentar limites de quantificação iguais ou abaixo de  $0,03 \mu\text{g/L}^{-1}$  (8).

Pela análise dos resultados obtidos, verifica-se que o método de ensaio cumpre bem todos os valores paramétricos exigidos por lei, bem como os exigidos pela lista de vigilância para os novos pesticidas, em qualquer uma das metodologias utilizadas para o cálculo dos limiares analíticos do método, sendo assim apropriado para a análise de pesticidas em águas de consumo.

### 7.2.5 Exatidão do Método Global

A exatidão do método de ensaio de alguns pesticidas foi avaliada com base nos resultados da participação em ensaios interlaboratoriais. A tabela 7.25 apresenta os resultados da participação em três ensaios interlaboratoriais (EIL1, EIL2 e EIL3) incluindo os respetivos erros relativos. Os ensaios foram realizados como descrito em 6.2.8.

**Tabela 7.25:** Avaliação da Exatidão em ensaios interlaboratoriais (EIL 1, EIL 2 e EIL 3) por UPLC-MS/MS.

Pesticida	Concentração Teórica <u>EIL 1</u> ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração Média da Amostra ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperação Média (%)	Concentração na Amostra Afetada com a Recuperação ( $\mu\text{g/L}$ )	Erro Relativo (%)
Bentazona	0,0804	0,0810	98,5	0,0822	2,3
Desetilsimazina	0,0537	0,0557	97,5	0,0572	6,5
Desetilatrastina	0,0901	0,0515	58,0	0,0887	-1,5
MCPA	0,0465	0,0466	106,6	0,0437	-6,0
2,4 D	0,0625	0,0662	114,6	0,0578	-7,5
Triclopir	0,0607	0,0628	103,6	0,0606	-0,1
Carbofurão	0,0549	0,0491	91,8	0,0535	-2,6
Clortolurão	0,0237	0,0146	62,8	0,0232	-2,2
Isoproturão	0,0744	0,0419	55,5	0,0756	1,6
Diurão	0,0608	0,0368	63,6	0,0578	-4,9
Linurão	0,0705	0,0403	55,8	0,0722	2,4
Metiocarbe	0,0395	0,0177	46,2	0,0382	-3,3
Pesticida	Concentração Teórica <u>EIL 2</u> ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração Média da Amostra ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperação Média (%)	Concentração na Amostra Afetada com a Recuperação ( $\mu\text{g/L}$ )	Erro Relativo (%)
Dimetoato	0,0395	0,0211	55,7	0,0379	-3,9
Pesticida	Concentração Teórica <u>EIL 3</u> ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentração Média da Amostra ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperação Média (%)	Concentração na Amostra Afetada com a Recuperação ( $\mu\text{g/L}$ )	Erro Relativo (%)
Carbendazima	0,0561	0,0556	89,0	0,0624	11,3
Dimetoato	0,0395	0,0812	83,0	0,0978	-4,6

Verifica-se que o método SPE-UPLC-MS/MS validado neste estudo, consegue quantificar com exatidão os diferentes pesticidas, apresentando valores de erro relativo entre 11,3% para a carbendazima e -6,0% para o MCPA.

### 7.2.6 Incerteza Expandida do Método

A estimativa da incerteza associada ao método de ensaio é efetuada tendo em conta as diversas fontes de incertezas provenientes das várias etapas de validação do método. O Decreto-Lei nº. 83/2011 estabelece especificações técnicas para a análise e monitorização dos parâmetros químico e físico-químicos caracterizadores do estado das massas de água superficiais e subterrâneas. É neste decreto-lei que está determinado que os critérios de desempenho mínimo para todos os métodos de análise são baseados numa incerteza de medição igual ou inferior a 50%, para um fator de expansão ( $k$ ) igual a 2, independente da abordagem utilizada para o cálculo das incertezas. Para águas de consumo a incerteza para os pesticidas está indicada no Decreto-Lei nº. 152/2017, que define uma incerteza de medição de apenas 30% para diversos pesticidas e, para uma série destes, podem ser autorizados valores mais elevados, até 80%.

Neste trabalho, para a estimativa da incerteza do método de ensaio foram realizadas duas abordagens. Na abordagem “*bottom-up*”, foram consideradas as componentes das incertezas associadas à interpolação da reta de calibração ( $u_{reta}$ ), à preparação dos padrões de calibração ( $u_{padrão}$ ), e à precisão intermédia do método ( $u_{prec}$ ).

Na abordagem “*top-down*”, usou-se a componente de incerteza associada à precisão intermédia do método ( $u_{prec}$ ), e a componente da exatidão do método (ensaio de recuperação) ( $u_{ext}$ ).

Na tabela 7.26, encontram-se apresentados os resultados obtidos para a incerteza expandida ( $U$ ) usando a abordagem “*bottom-up*”.

**Tabela 7.26:** Incerteza expandida do método de ULPC-MS/MS para análise de pesticidas através da abordagem "bottom-up".

<b>Pesticida</b>	<b><math>u_{reta}</math> (%)</b>	<b><math>u_{padrão}</math> (%)</b>	<b><math>u_{prec}</math> (%)</b>	<b><math>U</math> (%) (k=2)</b>
Oxamil	4,9	2,3	0,2	<b>10,7</b>
Bentazona	9,8	2,4	0,1	<b>22,4</b>
Desetilsimazina	5,0	2,4	0,3	<b>16,9</b>
Imidaclopride	6,4	2,6	0,2	<b>13,8</b>
Dimetoato	5,9	2,3	0,2	<b>12,7</b>
Cimoxanil	4,6	2,4	0,4	<b>10,4</b>
Desetilatrizona	7,6	2,3	0,2	<b>16,0</b>
Carbendazima	7,1	2,4	0,3	<b>17,8</b>
MCPA	9,7	2,4	0,3	<b>25,0</b>
2,4 D	11,6	2,3	0,3	<b>14,0</b>
Triclopir	9,1	2,3	0,4	<b>24,0</b>
Carbofurão	3,1	2,4	0,3	<b>9,3</b>
Desetilterbutilazina	3,9	2,3	0,2	<b>9,0</b>
Clortolurão	3,8	2,3	0,3	<b>9,0</b>
Isoproturão	4,9	2,5	0,3	<b>11,1</b>
Diurão	8,2	2,6	0,4	<b>17,2</b>
Metidatião	3,5	2,5	0,4	<b>8,8</b>
Linurão	6,3	2,5	0,2	<b>13,5</b>
Metiocarbe	10,2	2,4	0,4	<b>20,9</b>
Propanil	4,9	2,4	0,4	<b>11,0</b>
Pirimetanil	7,1	2,1	0,2	<b>14,9</b>
Tetraconazole	1,8	1,5	0,3	<b>4,7</b>
Dimoxistrobina	8,4	2,7	0,3	<b>17,6</b>
Famoxadona	7,7	2,6	0,4	<b>16,2</b>
Penconazole	5,9	2,7	0,2	<b>12,9</b>
Imazalil	10,0	2,7	0,4	<b>20,8</b>
Tebuconazol	4,8	2,5	0,3	<b>10,9</b>
Metconazol	7,8	2,5	0,3	<b>16,3</b>
Procloraz	5,2	2,7	0,3	<b>11,7</b>
Ipconazole	5,1	2,5	0,3	<b>11,5</b>
Oxadiazão	8,6	2,3	0,3	<b>17,7</b>

Como podemos observar a partir da tabela 7.26, as incertezas globais do método obtidas para cada pesticida na abordagem "bottom-up" encontram-se dentro do critério de aceitação estipulado pelos Decreto-Lei nº. 83/2011 e Decreto-Lei nº. 152/2017 (8,103). O pesticida que apresenta maior valor de incerteza expandida (25%) é o MCPA. Para todos os pesticidas, a componente que apresenta maior contribuição para os resultados obtidos consiste na incerteza associada à interpolação da reta de calibração.

Os resultados obtidos para a incerteza expandida ( $U$ ), usando a abordagem "top-down" estão apresentados na tabela 7.27.

**Tabela 7.27:** Incerteza expandida do método de ULPC-MS/MS para análise de pesticidas através da abordagem "top-down".

<b>Pesticida</b>	<b><math>u_{prec}</math> (%)</b>	<b><math>u_{ext}</math> (%)</b>	<b><math>U</math> (%) (k=2)</b>
Oxamil	0,2	13,7	27,5
Bentazona	0,1	6,3	12,6
Desetilsimazina	0,3	6,7	13,4
Imidaclopride	0,2	11,4	22,9
Dimetoato	0,2	9,0	18,0
Cimoxanil	0,4	13,1	26,3
Desetilatrazina	0,2	8,6	17,2
Carbendazima	0,3	10,8	21,6
MCPA	0,3	5,2	10,4
2,4 D	0,3	7,4	14,9
Triclopir	0,4	10,1	20,2
Carbofurão	0,3	5,1	10,2
Desetilterbutilazina	0,2	9,2	18,4
Clortolurão	0,3	9,1	18,2
Isoproturão	0,3	7,9	15,7
Diurão	0,4	9,2	18,5
Metidatião	0,4	9,3	18,6
Linurão	0,2	8,1	16,1
Metiocarbe	0,4	10,2	20,5
Propanil	0,4	8,6	17,3
Pirimetanil	0,2	13,4	26,9
Tetraconazole	0,3	8,1	16,3
Dimoxistrobina	0,3	8,3	16,7
Famoxadona	0,4	20,5	40,9
Penconazole	0,2	8,5	16,9
Imazalil	0,4	13,3	26,5
Tebuconazol	0,3	8,9	17,8
Metconazol	0,3	9,0	18,0
Procloraz	0,3	11,3	22,7
Ipconazole	0,3	12,5	25,1
Oxadiazão	0,3	11,5	23,0

Os resultados obtidos pela abordagem “top-down” para as incertezas expandidas apresentados na tabela 7.27 demonstram que todos os pesticidas cumprem o critério de aceitação determinado pelo Decreto-Lei nº. 83/2011 e pelo Decreto-Lei nº. 152/2017 (8). O pesticida que apresenta a maior incerteza do método é a famoxadona, resultado este esperado devido ao coeficiente de variação (18,1%) apresentado nos estudos de avaliação da recuperação média global.

### 7.2.7 Análise de Amostras

Neste trabalho, foram analisadas amostras de água de consumo humano e água naturais (subterrâneas e superficiais) de diferentes zonas de abastecimento e captação da EPAL e AdVT. No total foram analisadas mais de 500 amostras.

A tabela 7.28 apresenta os resultados obtidos para as amostras nas quais foram confirmados a presença de pesticidas com uma concentração igual ou acima de 30% do valor paramétrico pertinente estipulado pelo Decreto-Lei nº. 152/2017 (0,03 µg/L) (8).

Em relação aos resultados obtidos, apenas cinco pesticidas apresentaram valores acima do LOQ do método para amostras de águas subterrâneas e superficiais, sendo estes homologados em Portugal pela Direção-Geral da Alimentação e Veterinária (DGAV). Em todas as amostras analisadas os restantes pesticidas apresentaram valores inferiores aos limites de quantificação estabelecidos neste método de ensaio.

É possível observar a presença do pesticida clortolurão, a variar dependendo da época do ano, em todas as amostras da barragem de Monte Novo, localizada em Évora, sendo confirmadas maiores concentrações no fundo da barragem.

A maior quantidade de pesticidas foi quantificada na amostra de um poço subterrâneo localizado em Reguengos de Monsaraz, município também localizado no distrito de Évora, na região do Alentejo e na sub-região do Alentejo Central, que possui como principal fonte de economia o cultivo da vinha, da qual resulta a elevada produção de vinhos do município.

No global, a concentração individual e/ou a soma total dos pesticidas presentes nas amostras encontram-se abaixo dos valores estipulados pela legislação.

**Tabela 7.28:** Análise de pesticidas em várias amostras por SPE-UPLC-ESI-MS/MS. (n > 500)

Amostras	Data de Colheita da Amostra	Concentração (µg/L)				
		Bentazona	Clortolurão	Desetilterbutilazina	Imidaclopride	Tebuconazol
Monte Novo (Nível de Captação)	13/04/2021	<0,03	<b>0,069</b>	<0,03	<0,03	<0,03
Monte Novo (Zona Eufótica)	13/04/2021	<0,03	<b>0,070</b>	<0,03	<0,03	<0,03
Monte Novo (Fundo da Barragem)	13/04/2021	<0,03	<b>0,081</b>	<0,03	<0,03	<0,03
Reguengos de Monsaraz (Poço Subterrâneo)	26/05/2021	<0,03	<0,03	<b>0,065</b>	<b>0,036</b>	<b>0,087</b>
Vigia (Água Bruta - Entrada da ETA)	15/06/2021	<b>0,055</b>	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
Monte Novo (Água Bruta - Entrada da ETA)	20/07/2021	<0,03	<b>0,037</b>	<0,03	<0,03	<0,03
Monte Novo (Nível de Captação)	20/07/2021	<0,03	<b>0,035</b>	<0,03	<0,03	<0,03
Monte Novo (Zona Eufótica)	20/07/2021	<0,03	<b>0,034</b>	<0,03	<0,03	<0,03
Monte Novo (Fundo da Barragem)	20/07/2021	<0,03	<b>0,060</b>	<0,03	<0,03	<0,03

### 7.3 Determinação Quantitativa de Fármacos por SPE-UPLC-ESI-MS/MS

Atualmente a EPAL possui um método para a determinação quantitativa de 19 fármacos em águas de abastecimento, águas superficiais e águas subterrâneas.

A análise quantitativa destes analitos é realizada através do método de adição de padrão pelo traçado de uma curva de calibração com padrões preparados em matriz ajustada. Nesta metodologia foram introduzidos os fármacos fluconazol, clotrimazol e miconazol, através da otimização das condições do sistema UPLC-ESI-MS/MS, estudos de linearidade e definição da gama de trabalho.

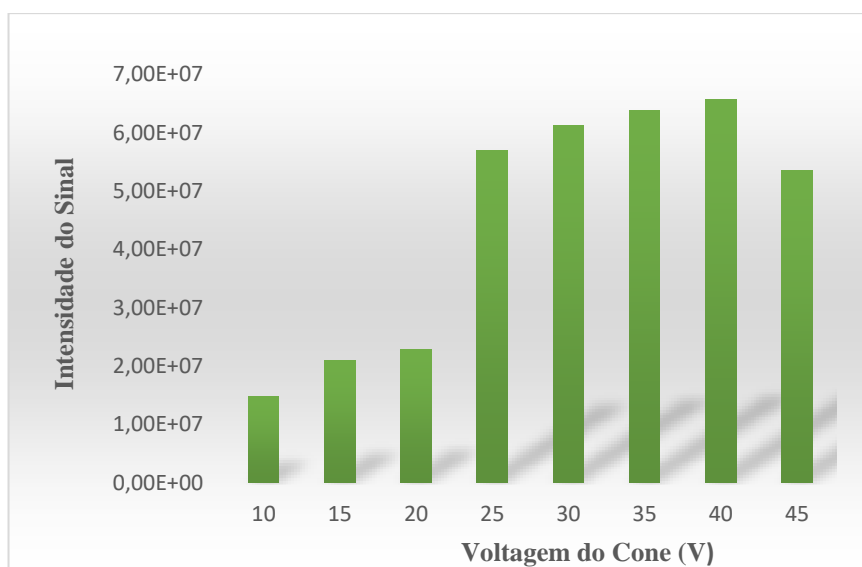
#### 7.3.1 Otimização das Condições do Espectrómetro de Massa

O trabalho experimental iniciou-se pela otimização dos parâmetros relacionados com a formação do íon precursor e dos íões produtos. Desta forma, foi otimizada a voltagem do cone e a voltagem do capilar na fonte de ionização, bem como a energia de colisão na célula de colisão.

Através de dados obtidos de estudos realizados para o fluconazol, clotrimazol e miconazol (104–106), observou-se que os compostos são ionizáveis em modo positivo.

A partir da infusão da solução padrão individual para infusão, descritas em 6.3.3.3.1, de cada composto, foi estudado o efeito da variação da voltagem de cone na fonte de ionização sobre a intensidade do sinal de cada íon precursor.

A figura 7.23 apresenta a influência da voltagem de cone na intensidade do sinal do íon precursor formado para o miconazol.



**Figura 7.23:** Variação da intensidade de sinal do miconazol com a voltagem de cone, por *electrospray* em modo positivo.

Como é possível observar pela figura anterior, a voltagem de cone para a formação do íon precursor com o máximo de intensidade para o miconazol corresponde à voltagem de 40 V. Para os outros dois fármacos, a escolha da voltagem de cone foi realizada da mesma maneira.

Após a otimização das condições de ionização, foram realizadas as otimizações relacionadas aos parâmetros de operação do analisador de massa.

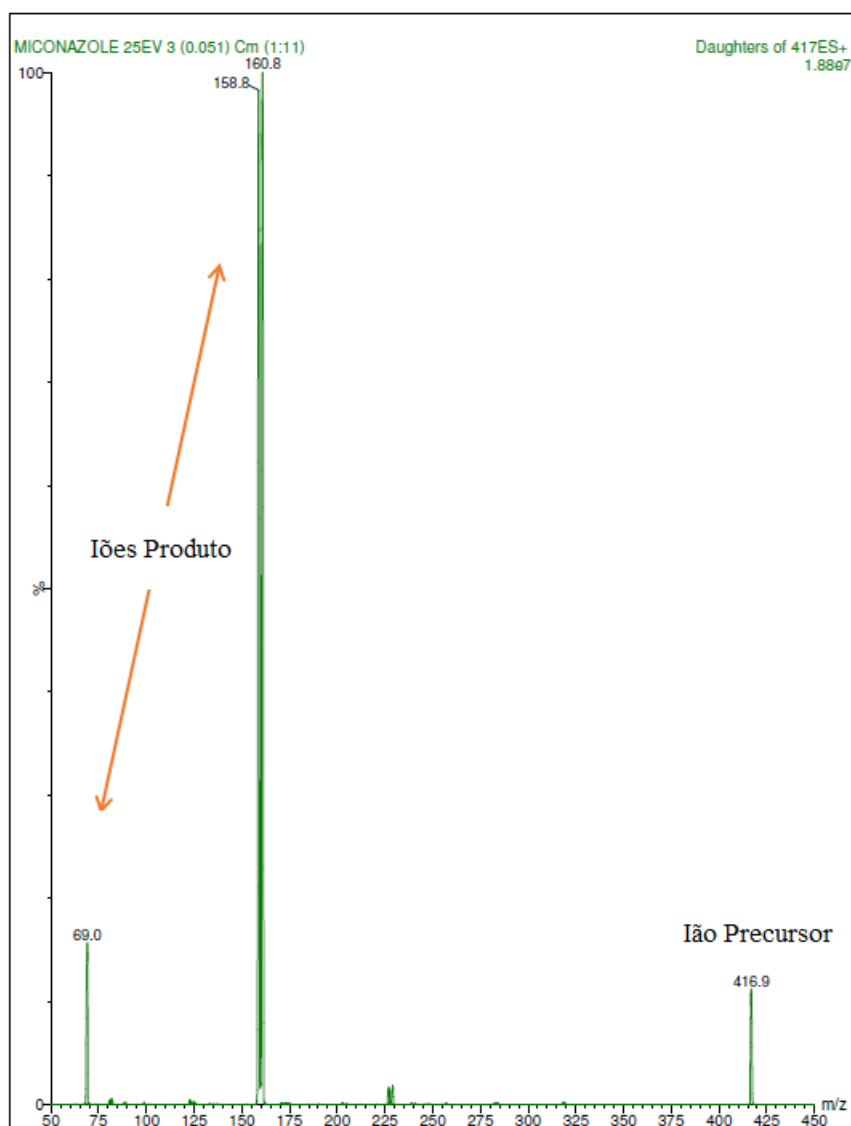
Para este método o modo de trabalho realizado em rotina também é o MRM, sendo necessária a escolha das transições MRM1 e MRM2. Para tal, começou-se por otimizar a energia de colisão necessária para a fragmentação dos íões precursores de cada um dos analitos em estudo. O analisador utilizado trata-se do triplo quadrupolo, desta forma, foi escolhido o modo de aquisição *product ion scan*.

De forma geral, o aumento da energia de colisão promove um aumento da fragmentação do íon precursor dando origem aos íões produto. A energia de colisão ótima é aquela que permite a formação de dois íões produtos com maior valor de intensidade de sinal, mas em que o íon precursor esteja presente de forma a garantir que os fragmentos obtidos se originam do mesmo.

Na figura 7.24, encontra-se o espectro de massa do miconazol obtido no modo de aquisição *product ion scan*.

Pela figura, podemos observar a presença de dois íões produto, sendo escolhido o íon de razão  $m/z$  160,8 para a transição MRM1 (quantificação), e o íon de razão  $m/z$  69 para a transição MRM2 (qualificação).





**Figura 7.24:** Espectro de massa do miconazol obtido no modo de operação *product ion scan*.

A energia de colisão selecionada para cada fármaco foi aquela que conduziu à formação dos íons produtos de maior intensidade de sinal no espectro de massas. As duas transições selecionadas para cada composto, bem como as energias de colisão aplicadas, estão descritas da tabela 6.27.

A voltagem aplicada ao capilar foi de 0,5 kV, dado que, é necessário a escolha de um determinado valor constante para todos os compostos. Este valor foi baseado em estudos anteriores realizados nas instalações da EPAL, onde foi verificado que a aplicação deste valor favorece a sensibilidade da maioria dos fármacos, tendo sido esta a voltagem escolhida na implementação do método analítico (4).

### 7.3.2 Validação do Método Cromatográfico

#### 7.3.2.1 Estudos de Linearidade dos Fármacos

Para determinar o intervalo de linearidade dos fármacos, trabalhou-se numa gama de concentrações baseando-se nos valores alvo para o limite máximo aceitável definido na lista de vigilância para cada composto.

A tabela 7.29 apresenta as equações das retas e os coeficientes de determinação para avaliação da linearidade dos dois métodos. Estes valores representam a gama de concentrações analisada para cada composto, para a qual se conseguiu um coeficiente de determinação ( $R^2 \geq 0,990$ ).

**Tabela 7.29:** Gama de trabalho, equação da reta e coeficiente de determinação para os fármacos no método ácido e no método básico.

Pesticida	Gama de Linearidade (µg/L)	Número de pontos	Equação da Reta	Coefficiente de Determinação ( $R^2$ )
<b>Método Ácido</b>				
Fluconazol	1,5-8,0	5	$y=1742,42x + 691,72$	0,9992
Clotrimazol	6,0-32,0	5	$y=2861,85x - 1666,5$	0,9977
Miconazol	8,7-46,4	5	$y=1019,63x - 2506,61$	0,9963
<b>Método Básico</b>				
Fluconazol	1,5-8,0	5	$y=6493,72x + 1253,58$	0,9958
Clotrimazol	6,0-32,0	5	$y=1760,94x - 3187,32$	0,9907
Miconazol	8,7-46,4	5	$y=548,269x - 1147,78$	0,9907

De seguida, foram realizados os restantes testes estatísticos para a garantia da linearidade. Na tabela 7.30, encontram-se resumidas as informações referentes à aplicação dos testes de Mandel, RIKILT, análise de resíduos e áreas normalizadas.

**Tabela 7.30:** Resultados dos testes estatísticos para os fármacos nos estudos de linearidade no método ácido e no método básico.

Pesticida	Número de pontos	Análise de Resíduos (+/-15%)	Teste Áreas Normalizadas (85-115%)	Teste RIKILT (90-110%)	Teste de Mandel (VT<F 0,05; 1; N-3)
<b>Método Ácido</b>					
Fluconazol	5	[-1,9; 2,6]	[84,9; 100,9]	[94-112]	0,296<18,51
Clotrimazol	5	[-2,8; 3,5]	[90,0; 100,0]	[96-104]	0<18,51
Miconazol	5	[-7,6; 12,6]	[100,0; 118,4]	[90-109]	0,496<18,51
<b>Método Básico</b>					
Fluconazol	5	[-9,1; 8,5]	[88,9; 100,5]	[97-110]	0,084<18,51
Clotrimazol	5	[-5,8; 6,7]	[100,0; 131,6]	[85-112]	2,658<18,51
Miconazol	5	[-3,4; 6,6]	[97,6; 123,1]	[87-110]	-0,673<161,45

É possível observar pela tabela que para os dois métodos os três fármacos apresentam resultados aceitáveis para os testes da análise de resíduos e Mandel. Sendo assim, foram necessárias as análises de outros fatores para a escolha do melhor método para cada fármaco.

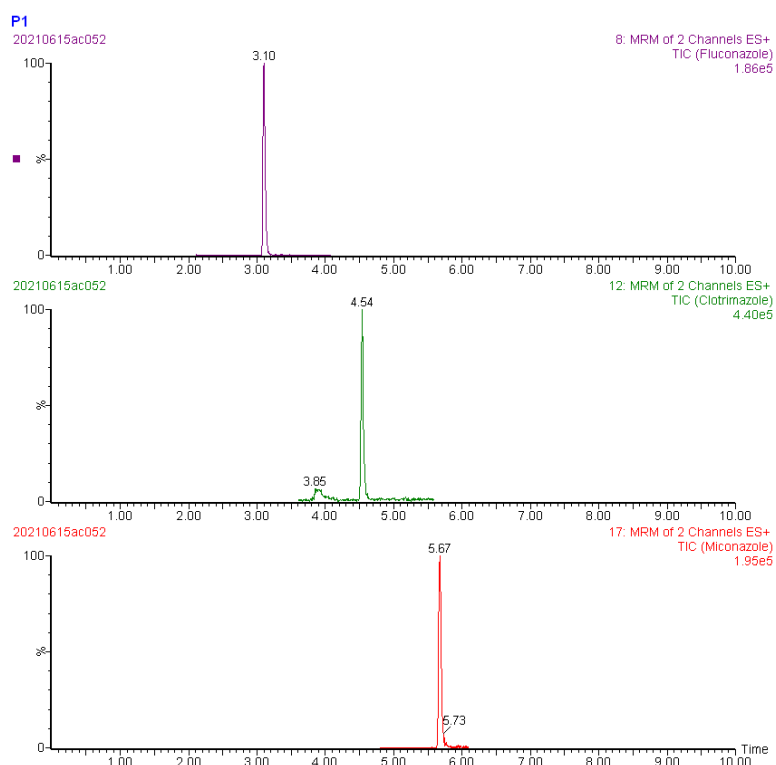
De maneira a confirmar que a gama de trabalho se encontra bem definida para cada fármaco, foram efetuados os cálculos dos limiares analíticos instrumentais com base nas calibrações lineares. A tabela 7.31 apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 7.31:** Limiares analíticos instrumentais obtidos com base na reta de calibração.

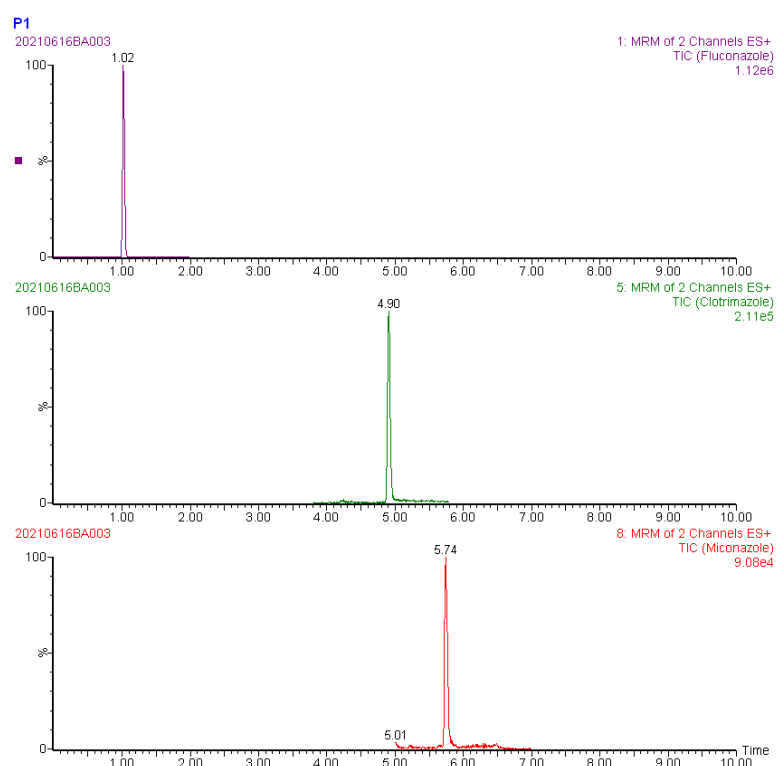
Pesticida	1º Padrão da gama de linearidade (µg/L)	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
<b>Método Ácido</b>			
Fluconazol	1,5	0,25	0,82
Clotrimazol	6,0	1,69	5,64
Miconazol	8,7	3,10	10,35
<b>Método Básico</b>			
Fluconazol	1,5	0,57	1,90
Clotrimazol	6,0	3,40	11,32
Miconazol	8,7	1,41	4,71

Por análise da tabela, conclui-se que o método ácido apresenta valor de LOQ inferior à concentração do primeiro padrão da curva de calibração para o fluconazol e clotrimazol, o que permite concluir que a gama de linearidade se encontra bem ajustada para estes dois compostos. Para o miconazol, a gama de linearidade encontra-se bem ajustada para o método básico.

Nas figuras 7.25 e 7.26 é possível observar os cromatogramas obtidos para os fármacos pela injeção da solução padrão de trabalho P1, descrita em 6.3.3.4.1, no método ácido e no método básico, respetivamente. As figuras apresentam a intensidade dos sinais e os tempos de retenção para cada fármaco em cada método.



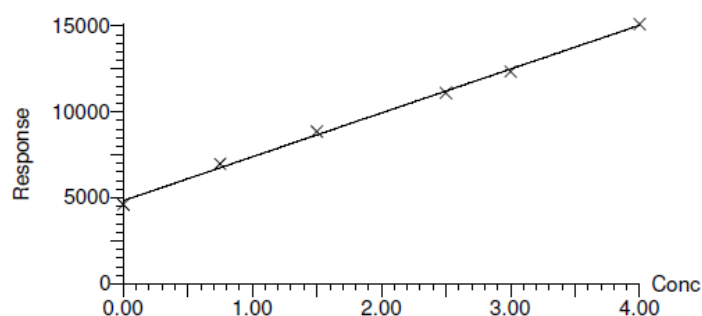
**Figura 7.25:** Cromatograma obtido por injeção da solução padrão de trabalho equivalente ao ponto mais baixo da gama de trabalho (P1) dos fármacos no método cromatográfico ácido, respeitante às transições MRM1 e respetivos tempos de retenção.



**Figura 7.26:** Cromatograma obtido por injeção da solução padrão de trabalho equivalente ao ponto mais baixo da gama de trabalho (P1) dos fármacos no método cromatográfico básico, respeitante às transições MRM1 e respetivos tempos de retenção.

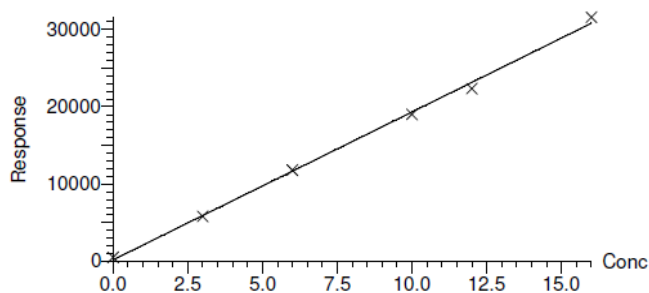
Tendo sido definidos os métodos de análise para cada fármaco foram realizadas curvas de calibração em matriz ajustada, através da injeção das soluções padrão de trabalho para validação em matriz ajustada, descrita em 6.3.3.4.2, de forma a analisar o comportamento de cada composto. As figuras 7.27, 7.28 e 7.29 apresentam os resultados obtidos para o fluconazol, clotrimazol e miconazol respectivamente.

Compound name: Fluconazole  
Correlation coefficient:  $r = 0.998795$ ,  $r^2 = 0.997592$   
Calibration curve:  $2552.13 * x + 4841.95$



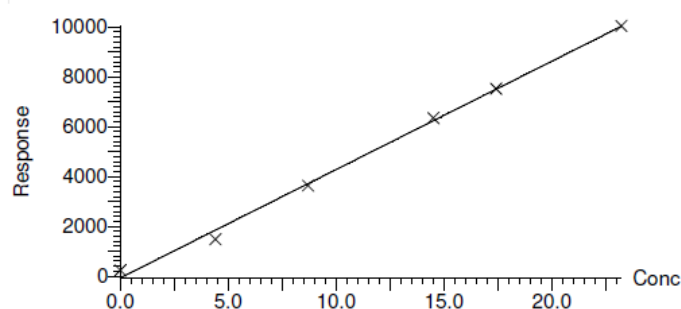
**Figura 7.27:** Curva de calibração pelo método de adição de padrão (matriz ajustada) para o fármaco fluconazol.

Compound name: Clotrimazole  
Correlation coefficient:  $r = 0.998834$ ,  $r^2 = 0.997669$   
Calibration curve:  $1914.89 * x + 174.572$



**Figura 7.28:** Curva de calibração pelo método de adição de padrão (matriz ajustada) para o fármaco clotrimazol.

Compound name: Miconazole  
 Correlation coefficient:  $r = 0.998258$ ,  $r^2 = 0.996519$   
 Calibration curve:  $435.338 * x + -68.3367$

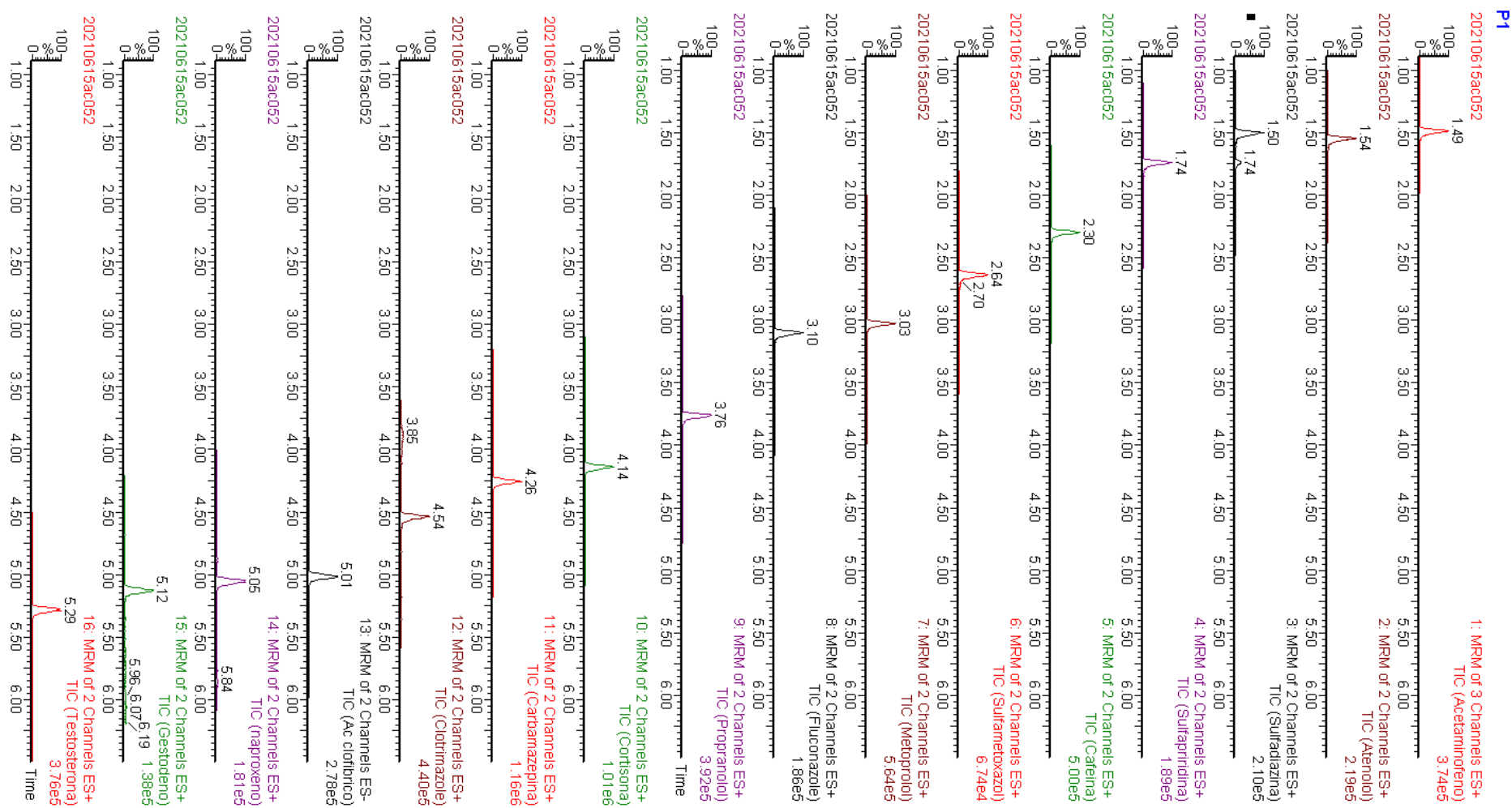


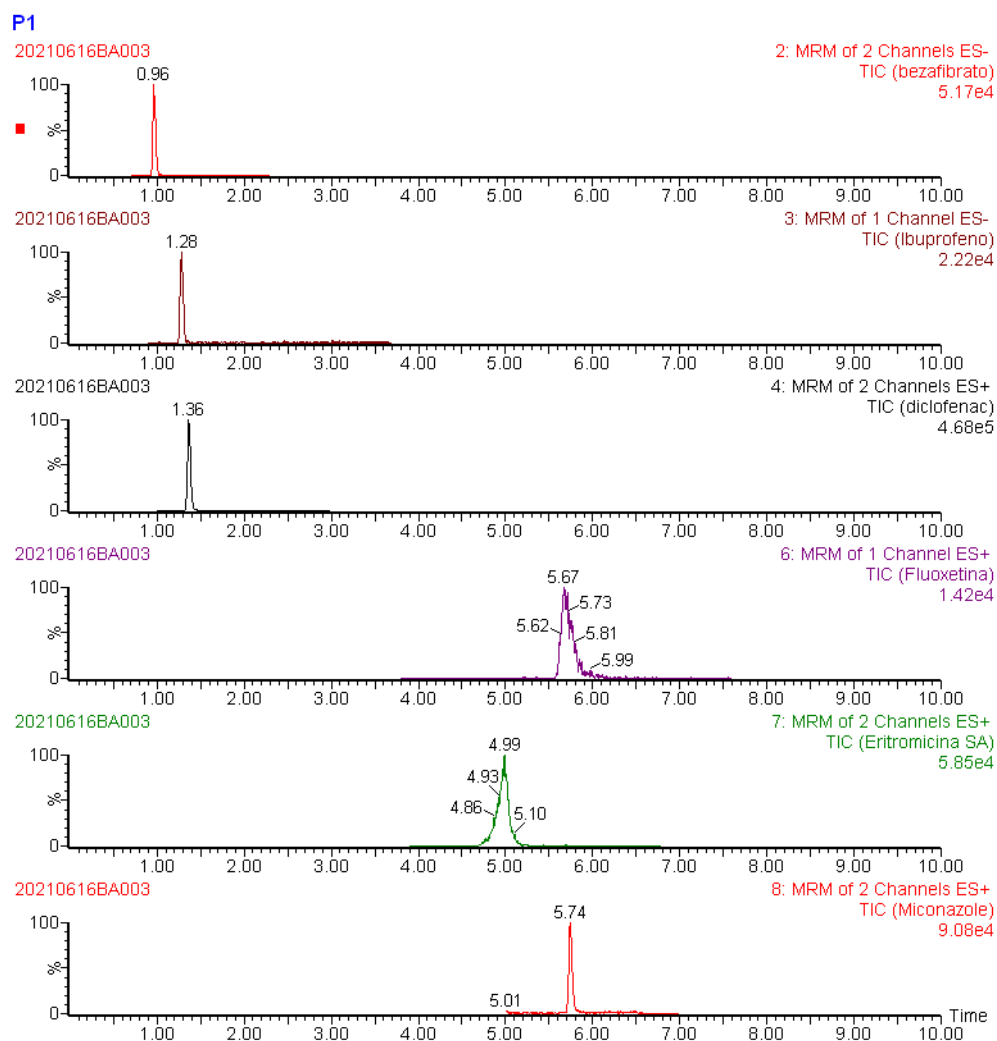
**Figura 7.29:** Curva de calibração pelo método de adição de padrão (matriz ajustada) para o fármaco miconazol.

Por análise das figuras, todos os compostos apresentam curvas de calibração bem ajustadas em matriz. É ainda possível observar que há presença do fármaco fluconazol na matriz em que foi realizado o estudo (figura 7.27), uma vez que, o extrato diluído da amostra (P0) não se encontra na origem.

Por fim, as figuras 7.30 e 7.31 apresentam os cromatogramas da solução padrão de trabalho, equivalente ao padrão mais baixo da gama de trabalho (P1), resultante das transições MRM1 para todos os fármacos monitorizados nos métodos ácido e básico, respetivamente.

**Figura 7.30:** Cromatograma obtido por injeção da solução padrão de trabalho equivalente ao ponto mais baixo da gama de trabalho (P1) de todos os fármacos monitorizados pelo método cromatográfico ácido, respeitante às transições MRM1 e respetivos tempos de retenção.





**Figura 7.31:** Cromatograma obtido por injeção da solução padrão de trabalho equivalente ao ponto mais baixo da gama de trabalho (P1) de todos os fármacos monitorizados pelo método cromatográfico básico, respeitante às transições MRM1 e respetivos tempos de retenção.





## Capítulo 8 - Conclusões e Perspetivas Futuras

Os estudos realizados permitiram concluir que o método de ensaio de determinação quantitativa de pesticidas realizado pela EPAL utilizando o equipamento GC/MS, dentro da gama de trabalho definida, não é adequado para os sete pesticidas estudados, uma vez que não apresentavam sensibilidade e/ou valores aceitáveis face aos critérios de aceitação interno definidos para os testes estatísticos.

A otimização das condições do sistema UPLC-ESI-MS/MS permitiu desenvolver um método seletivo e com alta sensibilidade em que todos os 31 pesticidas estudados são analisados em 17 minutos.

Os estudos de validação realizados para os novos pesticidas e para os pesticidas já monitorizados pela EPAL, dentro da gama de trabalho definida, apresentaram bons resultados nos testes estatísticos face aos critérios de aceitação internos definidos quer para ajustes lineares ou ajustes não lineares.

O método apresenta boa repetibilidade, com coeficiente de variação inferiores a 8% para todos os pesticidas, e em termos de precisão intermédia, os coeficientes de variação são inferiores a 10%.

A razão MRM1/MRM2 mostrou ser estável ao longo da gama de trabalho para todos os compostos, podendo ser utilizada como critério de identificação dos compostos, juntamente com o tempo de retenção dos mesmos.

Os estudos de efeito da matriz permitiram concluir que é necessária a preparação prévia da amostra afim de atingir os limiares analíticos definidos pela legislação em vigor. Ainda devido aos estudos de efeito de matriz foi possível identificar os compostos que apresentavam efeitos de supressão iónica e os compostos que não apresentavam homogeneidade em suas recuperações nas matrizes estudadas, sendo estes compostos passíveis de correção com padrões internos deuterados (“*surrogate*”).

A estimativa de incertezas do método de ensaio pelas duas metodologias abordadas é bastante aceitável levando em consideração os critérios estabelecidos pela legislação em vigor. Os valores obtidos foram todos inferiores a 50%.

A aplicabilidade do método foi testada em amostras reais de água para consumo, recolhidas em diferentes pontos ao longo do sistema de abastecimento da EPAL e da AdTV. Dos 31 pesticidas analisados, cinco, nomeadamente betazona, clortolurão, desetilterbutilazina, imidaclopride e tebuconazol foram quantificados nas amostras das captações (subterrâneas e superficiais), não sendo quantificados quaisquer pesticidas em amostras de água para consumo humano.

Os níveis de pesticidas não ultrapassaram o valor paramétrico de 0,1 µg/L para os pesticidas individualmente ou 0,5 µg/L para a soma total dos pesticidas, estando de acordo com os valores estipulados pela legislação.

Em geral, o método de ensaio SPE-UPLC-ESI-MS/MS para a determinação quantitativa de pesticidas demonstrou ser um método linear, preciso e exato, apresentando ainda limiares analíticos globais abaixo do limite imposto pela legislação em vigor.

Para os fármacos, a otimização das condições do sistema UPLC-ESI-MS/MS permitiu desenvolver um método seletivo para os três compostos implementados.

Os estudos de validação realizados para o fluconazol, clotrimazol e miconazol apresentaram bons resultados nos testes estatísticos face aos critérios de aceitação internos definidos para ajustes lineares. Como estudos futuros nesta área sugere-se a continuidade da validação através da realização de ensaios de precisão, exatidão e recuperação.

## Bibliografia e Referências Bibliográficas

1. Heller L, Pádua, V L. Abastecimento de água para consumo humano. 2.<sup>a</sup> ed. Belo Horizonte; 2018.
2. Libânio M. Fundamentos de Qualidade e Tratamento de Água. 4.<sup>a</sup> ed. Campinas: Átomo; 2016.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Brasília; 2006.
4. Gaffney V de J. Monitorização de Fármacos na Água Bruta e na Água para Consumo Humano por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência Associada à Espectrometria de Massa Tandem. Dissertação de Doutoramento. Faculdade de Farmácia - Universidade de Lisboa; 2014.
5. Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos. Acesso em: 24 de Janeiro de 2021. Disponível em: <http://www.ersar.pt/pt/setor/caracterizacao>
6. Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto, Diário da República, I Série, n.º 164. 27 de Agosto de 2007.
7. Medina AM. Implementação de Planos de Controlo de Qualidade da Água. Relatório de Estágio. Instituto Politécnico de Coimbra; 2015.
8. Decreto-Lei n.º 152/2017 de 7 de Dezembro, Diário da República, I Série, n.º 235, 7 de Dezembro de 2017. 2017.
9. Águas de Portugal. Acesso em 24 de Janeiro de 2021. Disponível em: <https://www.adp.pt/pt/grupo-adp/historia/?id=7>
10. Ministério do Ambiente do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Plano Estratégico de Abastecimento de Água e de Saneamento de Águas Residuais. 2007.
11. Empresa Portuguesa das Águas Livres. Acesso em 17 de Janeiro de 2021. Disponível em: <https://www.epal.pt/>
12. EPAL – Empresa Portuguesa das Águas Livres SA. Qualidade da Água para Consumo Humano. Relatório Anual. 2013.
13. EPAL – Empresa Portuguesa das Águas Livres SA. Qualidade da Água para Consumo Humano. Relatório Anual. 2006.
14. Directiva 2000/60/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro, Jornal oficial das Comunidades Europeias, L 327, 2000.
15. Decisão n.º 2455/2001/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Novembro, Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L 331, 2001.
16. Directiva 2013/39/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 12 de Agosto, Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L 226, 2013.
17. Decisão de Execução n.º 2020/1161/CE, do Parlamento Europeu, de 4 de Agosto, Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L 257/32, 2020.
18. Delaplane KS. Pesticide usage in the United States: history, benefits, risks, and trends. Univ Georg Coll Agric Environ Sci Bull 1121/Reprinted Novemb. 2000;61.
19. Pesticide Residues in Food, World Health Organization. Acesso em 1 de Outubro de 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pesticide-residues-in-food>
20. Kaur R, Mavi GK, Raghav S, Khan I. Pesticides Classification and its Impact on Environment. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.

- 2019;8(03):1889–97.
21. World Health Organization. Exposure to Highly Hazardous Pesticides: A Major Public Health Concern. Acesso em 1 de Outubro de 2021. Disponível em: [https://www.who.int/ipcs/features/hazardous\\_pesticides.pdf](https://www.who.int/ipcs/features/hazardous_pesticides.pdf)
  22. Patel, D.M., Jones, R.R., Booth, B.J., Olsson, A.C., Kromhout, H., Straif, K., Vermeulen, R., Tikellis, G., Paltiel, O., Golding, J., Northstone, K., Stoltenberg, C., Håberg, S.E., Schüz, J., Friesen, M.C., Ponsonby, A.-L., Lemeshow, S., Linet, M.S., Magn MHIJC. Parental occupational exposure to pesticides, animals and organic dust and risk of childhood leukemia and central nervous system tumors: Findings from the International Childhood Cancer Cohort Consortium (I4C). :146: 943-952. <https://doi.org/10.1002/ijc.32388>.
  23. Internacional Agency for Reasearch on Cancer. Parental occupational exposure to pesticides, animals, and organic dust and risk of childhood leukaemia and central nervous system tumours. Acesso em 1 de Outubro de 2021. Disponível em: <https://www.iarc.who.int/news-events/parental-occupational-exposure-to-pesticides-animals-and-organic-dust-and-risk-of-childhood-leukaemia-and-central-nervous-system-tumours/>
  24. Américo JHP, Messias TG, Torres NH, Américo GHP. Desreguladores endócrinos no ambiente e seus efeito na biota e saúde humana. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 2012;
  25. Portugal FCM. Validação de um método de ensaio para análise de pesticidas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa utilizando como método de preparação da amostra a extração em fase sólida. Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa; 2004.
  26. Fernandes C. Aplicação de Técnicas Analíticas para Detecção de Resíduos de Pesticidas por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espetrometria de Massas. Relatório de Estágio para Cumprimento dos Requisitos Necessários à Obtenção do Grau de Mestre. Instituto Politécnico de Tomar; 2014.
  27. Martínéz-Matías N, Rodríguez-Medina J. Fundamental Concepts of Azole Compounds and Triazole Antifungals: A Beginner's Review. *P R Health Sci J*. 2018;
  28. Giliomee J. Pesticides. Em: *Environmental management in South Africa*. 2.<sup>a</sup> ed. Juta; 2009. p. 746–64.
  29. Santos AP. Determinação de Compostos Organoclorados e Hidrocarbonetos Poliaromáticos na Lagoa de Carapicuíba-SP. Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre. Universidade de São Paulo; 2007.
  30. Vinhal DC, Soares VHC. Intoxicação por organofosforados: Uma revisão da literatura. *Revista Científica FacMais*. 2018;
  31. Braccini AL, Brighenti AM, Tessman DJ, Constantin J, Bacarin MA, Oliveira MF, et al. *Biologia e manejo de plantas daninhas*. Omnipax. 2011. 348 p.
  32. Amaro P. Pesticidas, saúde e ambiente e os tabus dos pesticidas em Portugal. *Revista de Ciências Agrárias*. 2008;201-216.
  33. Direção-Geral de Alimentação e Veterinária. *Pesticidas a pesquisar em água destinada ao consumo humano, triênio 2019-2021*. Lisboa; 2018.
  34. Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto, *Diário da República, I Série A*, n.º 176, 1 de Agosto de 1998.
  35. Decreto- Lei n.º 103/2010 de 24 de Setembro, *Diário da República, I Série*, n.º 187. 24 de Setembro de 2010.
  36. Decreto-Lei n.º 218/2015 de 7 de Outubro, *Diário da República, I Série*, n.º 196. 7 de Outubro de 2015.

37. European Commission. Options for a strategic approach to pharmaceuticals in the environment. Task 1 report - Revised Version. 2016.
38. Comissão das Comunidades Europeias. Abordagem Estratégica da União Europeia relativa aos Produtos Farmacêuticos no Ambiente. 2019.
39. Gaffney VJ, Cardoso V, Cardoso E, Teixeira AP, Martins J BM& AC. Occurrence and Behaviour of Pharmaceutical Compounds in a Portuguese Wastewater Treatment Plant: Removal Efficiency through Conventional Treatment Processes. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017;24:14717–14734. doi: 10.1007/s11356-.
40. Salgado R, Pereira VJ, Carvalho G, Soeiro R, Gaffney V, Almeida C, Cardoso VV, Ferreira E, Benoliel MJ, Ternes TA, Oehmen A, Reis MAM NJ. Photodegradation Kinetics and Transformation Products of Ketoprofen, Diclofenac and Atenolol in Pure Water and Treated Wastewater. *J Hazard Mater*. 2013;244–5, 516–527. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.10.0.
41. Gaffney V, Cardoso VV, Rodrigues A, Ferreira E BM& AC. Analysis of Pharmaceutical Compounds in Water by SPE-UPLC-ESI-MS/MS. *Química Nova*. 2014;37(1)138–149. <https://doi.org/10.1590/S0100-404220>.
42. Gaffney V, Almeida CMM, Rodrigues A, Ferreira E BM& CV. Occurrence of Pharmaceuticals in A Water Supply System & Related Human Health Risk assessment. *Water Research*. 2015;72, 199–208. doi: 10.1016/j.watres.2014.10.027.
43. Silva S, Rodrigues JA, Silva S, Coelho MR, Martins A, Cardoso E, Cardoso VV, Benoliel MJ AC. Occurrence of pharmaceutical active compounds in sewage sludge from two urban wastewater treatment plants and their potential behaviour in agricultural soils. *Environmental Science: Water Research & Technology*. 2021;7, 969–82, doi: 10.1039/d1ew00132a.
44. Rodrigues J, Albino S, Silva S, Cravo A, Cardoso VV BM& AC. Development of a Multiresidue Method for the Determination of 24 Pharmaceuticals in Clams by QuEChERS and Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. *Food Anal Methods*. 2019;12(4), 838–851. doi: 10.1007/s12161-018-01418-y.
45. Lockwood S, Saidi N, Morgan VA. Options for a strategic approach to pharmaceuticals in the environment Task 1 Report. 2016.
46. INFARMED I.P. - Gabinete Jurídico e Contencioso. Classificação farmacoterapêutica de medicamentos - Despacho n.º 4742/2014, de 21 de março. *Legis Farm Compil* 2014; Disponível em: [https://www.infarmed.pt/documents/15786/1072289/110-AB6\\_Desp\\_4742\\_2014\\_VF.pdf](https://www.infarmed.pt/documents/15786/1072289/110-AB6_Desp_4742_2014_VF.pdf)
47. Infarmed. Formulário Nacional de Medicamentos. Acesso em 02 de Julho de 2021. Disponível em: <https://extranet.infarmed.pt/fnm-fo/#/>
48. Moreira MIDMCG. Azóis: Farmacologia e Interações Medicamentosas. 2010;65. Disponível em: <http://bdigital.ufp.pt/handle/10284/3250>
49. Cortes LG, Marinov D, Sanseverino I, Cuenca AN, Niegowska M, Rodriguez EP, et al. JRC Technical Report: Selection of substances for the 3rd Watch List under WFD. 2020. 239 p.
50. PubChem. Acesso em 01 de Outubro de 2021. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
51. Directiva 2010/84/UE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 15 de Dezembro, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 348/74, 2010.
52. WHO, “Guidelines for Drinking-water Quality”, Addendum Microbiological Agents in Drinking Water, 2nd Ed., 2002.
53. World Health Organization. Pharmaceuticals in Drinking-Water. Acesso em 1 de Outubro de 2021. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44630/9789241502085\\_eng.pdf;jsessionid=](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44630/9789241502085_eng.pdf;jsessionid=)

- 78DB0ADCFEADE48DDA15E348500BBCCF?sequence=1
54. Sigma Aldrich. Guide to Solid Phase Extraction. Acesso em 02 de Fevereiro de 2021. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
  55. Jurgen HG. Mass Spectrometry: A textbook. 3rd Edition. 3.<sup>a</sup> ed. Springer International Publishing; 2017.
  56. Supelco. Solid Phase Extraction Products. Acesso em 03 de Fevereiro de 2021. Disponível em: [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General\\_Information/t402150.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General_Information/t402150.pdf)
  57. Jardim ICSF. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Scientia Chromatographica*. 2010;13–25.
  58. Liska I. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview. *J Chromatogr*. 2000;3–16.
  59. Ramos F, Castilho MC, Silveira MIN. Extração em fase sólida (SPE): II. Mecanismos de extração. 1996.
  60. Orlando RM, Cordeiro DD, Ana Elisa Barreto Mathias KRR, Gil EDS. Pré-Tratamento de Amostras. *Vita Sanitas*. 2009;(3):122–39.
  61. Fritz JS. *Analytical Solid-Phase Extracion*. New York: Wiley-VCH; 1999.
  62. Raisglid ME, Burke MF. Fundamentals of solid phase extraction and its application to environmental analyses. Em: *Adsorption and Its Applications in Industry and Environmental Protection*. Elsevier Science B.V.; 1998. p. 37–75.
  63. Oliveira EC. Aplicação da Extração em Fase Sólida na Pré-concentração de Compostos Fenólicos Clorados em Efluentes de Branqueamento de Celulosa. Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1999.
  64. Douglas AS, James H, Stanley RC. *Principles of Instrumental Analysis*. 6.<sup>a</sup> ed. Thomson Brooks/Cole Publishing; 2007. .
  65. McNair M, Miller J. *Basic Gas Chromatography*. 2.<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons, Inc; 2009.
  66. Collins CH. Os Primórdios Da Cromatografia Líquido-Líquido. *Scientia Chromatographica*. 2009;7–10.
  67. Augusto F. Cromatografia a Gás – Um curso em diapositivo. Acesso em 17 de Setembro de 2021. Disponível em: [chemkeys.com/br/2000/07/18/cromatografiaa-gas-curso-em-diapositivos/](http://chemkeys.com/br/2000/07/18/cromatografiaa-gas-curso-em-diapositivos/)
  68. Howard GB. Chromatography Fundamentals, Part VI: The Gaussian Distribution and Moment Analysis. *LCGC North Am*. 2019;37(4):269–273.
  69. Howard GB. Chromatography Fundamentals, Part V: Theoretical Plates: Significance, Properties, and Uses. *LCGC North Am*. 2018;36(11):830–835.
  70. Weil H, Willams TI. History of chromatography. *Nature*. 1950;166(4232):1000–1.
  71. Nascimento R, Lima A, Barbosa P, Silva V. Cromatografia gasosa Aspectos teóricos e práticos. Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará; 2019.
  72. Restek Pure Chromatography (USA). Guide to GC Column Selection and Optimizing Separations. 2013.
  73. Noronha JP. Biorgânica Analítica Programa Avaliação. 2019;1–72.
  74. Pramanik BN, Lee MS, Chen G. Characterization of Impurities and Degradants Using Mass Spectrometry. *Charact Impurities Degrad Using Mass Spectrom*. 2011;
  75. Aston FW. Breve Revisão de Espectrometria de Massa e da Técnica PDMS. PUC-Rio

- Certificação Digit 0124802/CA 2003;140. Disponível em: [http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0124802\\_03\\_pretextual.pdf](http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0124802_03_pretextual.pdf)
76. Jocelyn Paré, J R Yaylayan V. Mass spectrometry: Principles and applications. Em: Instrumental Methods in Food Analysis. 1997. p. 239–266.
  77. Gross JH. Electron Impact and Chemical Ionization. Em: Encyclopedia of Analytical Science. 3rd ed. Academic Press; 2018. p. 334–43.
  78. Lanças FM. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente «compatíveis»? II. A escolha do analisador de massas. Sci Chromatogr. 2013;5(1):27–46.
  79. Videira A. Validação do Método de Ensaio para Análise de Ácidos Haloacéticos. Dissertação para obtenção do grau de mestre. Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências; 2012.
  80. Maldaner L, Jardim ICSF. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. Quim Nova. 2009;32(1):19–34.
  81. Sargaço RB. Otimização e validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para a determinação do edulcorante ciclamato. Ocorrência em adoçantes de mesa. Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa; 2013.
  82. Shah K, Sheliya KG. Ultra Performance Liquid Chromatography ( UPLC ): a Modern Chromatography Technique. Pharma Sci Monit. 2013;4(3).
  83. Pitt JJ. Principles and Applications of Liquid ChromatographyMass Spectrometry in Clinical Biochemistry. Clin Biochem Rev. 2009;30(1):19–34.
  84. Agilent-Technologies. Basics of LC/MS. 1998;
  85. Mordehai A, Fjeldsted J. Agilente Jet Stream Thermal Gradient Focusing Technology. Technical Note. Santa Clara, CA, USA: Agilente Technologies; 2009.
  86. ThermoFisher Scientific. Hardware Manual. TSQ Series II. 2019.
  87. Crotti AEM, Vessecchi R, Lopes JLC, Lopes NP. Espectrometria de massas com ionização por «electrospray»: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. Quim Nova. 2006;29(2):287–92.
  88. Ettlin D. Triple Quads Training Course. Thermo Scientific; 2020.
  89. Triple Quadrupole Mass Spectrometry. Acesso em 16 de Março de 2021. Disponível em: <https://www.creative-proteomics.com/technology/triple-quadrupole-mass-spectrometry.htm>
  90. Thermo Finnigan. Mass Spectrometer Scan Types. Disponível em: [https://www.enovatia.com/wp-content/uploads/2009/07/Scan\\_types.pdf](https://www.enovatia.com/wp-content/uploads/2009/07/Scan_types.pdf)
  91. Estudo de Fragmentação. Disponível em: [http://www.uel.br/eventos/semanadaquimica/2010/arquivos/minicurso/estudo\\_fragmentacao-m.pdf](http://www.uel.br/eventos/semanadaquimica/2010/arquivos/minicurso/estudo_fragmentacao-m.pdf)
  92. Taylor PJ. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. Clin Biochem. 2005;38(4):328–34.
  93. Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. Clin Chem. 2003;49(7):1041–4.
  94. Jessome LL. Ion Suppression: A Major Concern in Mass Spectrometry. LCGC North Am. 2006;24(5):498–510.
  95. EPAL - Grupo Águas de Portugal. Validação de Métodos de Ensaio Cromatográficos (GC, HPLC). Procedimento Técnico Interno. 2021. p. 1–41.
  96. Augusto C, Cabrita L, Marques A, Contreiras A, Ferreira A, Alfaiate B, et al. Validação de métodos internos de ensaio em análise química. Vol. 13, Guia Relacre 13, Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. 2000. 1–50 p.



97. ISO (International Organization for Standardization). ISO 8466-1, Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics (Part 1). International Standard. 1990.
98. ISO (International Organization for Standardization). ISO 8466-2; Water quality, Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 2: Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions. 2001;
99. “Model for the calculation of calibration curves”, RIKILT report 91.02, January 1991, J.M.P: van Trijp & A.H. Roos, RIKILT-DLO, Wageningen, Netherlands.
100. Filho AM, dos Santos FN, Pereira PA de P. Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC-MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples. *Microchem J* 2010;96(1):139–45. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2010.02.018>
101. Raina-Fulton R, Behdarvandan A, Mohammad A. The Challenges of Fungicide Analyses Using Gas Chromatography and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods. 2018;3(1):1–7.
102. Zayats MF, Leschev SM, Zayats MA. A novel method for the determination of some pesticides in vegetable oils based on dissociation extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2016;33(8):1337–45.
103. Decreto-Lei n.º 83/2011 de 20 de Junho, Diário da República, I Série, N.º 117, 20 de Junho de 2011.
104. Balloch S, Brown H, Calton L, Hammond G. UPLC-MS / MS Analysis of Methotrexate in Plasma and Serum for Clinical Research. :1–5.
105. Lisi L, Ciotti GMP, Navarra P. Development of an uplc-ms/ms method for quantitative analysis of clotrimazole in human plasma samples. *Separations*. 2020;7(4):1–9.
106. Mallet C, Cleland G, Burgess JA. Multi-Residue Analysis of Pharmaceuticals and Personal Care Products ( PPCPs ) in Water Using the ACQUITY UPLC H-Class System and the Xevo TQD Tandem Mass Spectrometer. *Waters - Appl note*. 2014;1–12.
107. Guia RELACRE 31. Quantificação da Incerteza de Medição em Ensaios Químicos e Físico-Químicos. 2018.

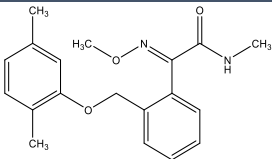
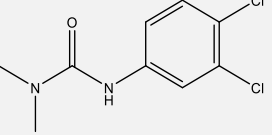
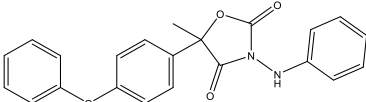
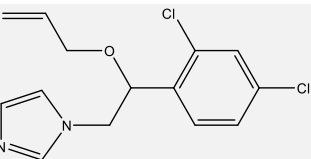
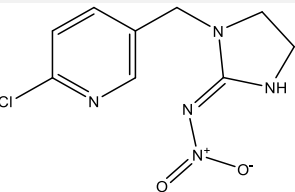
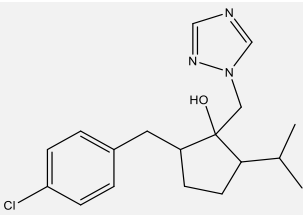
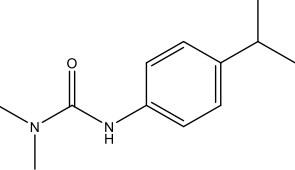
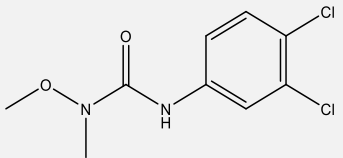
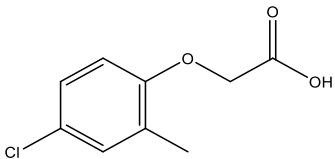
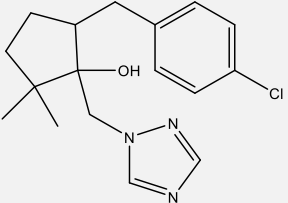


## Anexos

### Anexo 1 – Propriedades Físico-Químicas dos Pesticidas

**Tabela A.1:** Propriedades físico-químicas dos pesticidas em estudo (49,50).

Pesticida	Classificação (Alvo de ação)	Estrutura Química	Massa Molecular	Log $k_{ow}$
2,4-D	Herbicida		221,0	2,81
Bentazona	Herbicida		240,3	2,34
Carbendazima	Fungicida		191,2	1,52
Carbofurão	Inseticida (Carbamato)		221,2	2,32
Cimoxanil	Fungicida		198,2	0,67 (pH 7) 0,59 (pH 5)
Clortolurão	Herbicida		212,7	2,41
Desetilatrazina	Herbicida (Triazínico)		187,6	1,51
Desetilsimazina	Herbicida (Triazínico)		173,6	1,15
Desetilterbutilazina	Herbicida (Triazínico)		201,7	2,23
Dimetoato	Inseticida (Organofosforado)		229,3	0,78

Dimoxistrobina	Fungicida		326,4	3,6
Diurão	Herbicida		233,1	2,68
Famoxadona	Fungicida		374,4	4,65
Imazalil	Fungicida (Composto Azólico)		297,2	3,82
Imidaclopride	Inseticida		255,7	0,57
Ipconazol	Fungicida (Composto Azólico)		333,9	4,49
Isoproturão	Herbicida		206,3	2,87
Linurão	Herbicida		249,1	3,20
MCPA	Herbicida		200,6	3,25
Metconazol	Fungicida (Composto Azólico)		319,8	3,85 (20°C, pH 7,2 – 8)

Metidatião	Inseticida (Organofosforado)		302,3	2,20
Metiocarbe	Inseticida (Carbamato)		225,3	2,92
Oxadiazão	Herbicida		345,2	4,80
Oxamil	Inseticida (Carbamato)		219,3	-0,47
Penconazol	Fungicida (Composto Azólico)		284,2	3,72 (25 °C)
Pirimetanil	Fungicida		199,2	2,84
Prochloraz	Fungicida (Composto Azólico)		376,7	4,12
Propanil	Herbicida		218,1	3,07
Tebuconazol	Fungicida (Composto Azólico)		307,8	3,7
Tetraconazol	Fungicida (Composto Azólico)		372,1	3,56
Triclopir	Herbicida		256,5	0,42 (pH 5) - 0,45 (pH 7) -0,96 (pH 9)

## Anexo 2 – Legislação Portuguesa

**Tabela A.2. 1:** Valores paramétricos estabelecidos para efeitos de verificação da conformidade da qualidade da água destinada ao consumo humano definidos pelo anexo I do Decreto-Lei n.º 152/2017 (8).

Parte II — Parâmetros químicos			
Parâmetro	Valor paramétrico	Unidade	Observações
Acetilamida .....	0,10	µg/l	Nota 1.
Antimónio .....	5,0	µg/l Sb	
Arsénio .....	10	µg/l As	
Benzeno .....	1,0	µg/l	
Benzo(a)pireno .....	0,010	µg/l	Nota 2.
Boro .....	1,0	mg/l B	
Bromatos .....	10	µg/l BrO <sub>3</sub>	
Cádmio .....	5,0	µg/l Cd	
Cianetos .....	50	µg/l CN	Notas 3 e 4.
Chumbo .....	10	µg/l Pb	
Cloreto de vinilo .....	0,50	µg/l	
Crómio .....	50	µg/l Cr	
Cobre .....	2,0	mg/l Cu	Nota 1.
1,2-dicloroetano .....	3,0	µg/l	
Epícloridrina .....	0,10	µg/l	
Fluoretos .....	1,5	mg/l F	
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP).	0,10	µg/l	Nota 11.
Mercúrio .....	1,0	µg/l Hg	
Níquel .....	20	µg/l Ni	
Nitratos .....	50	mg/l NO <sub>3</sub>	
Nitritos .....	0,50	mg/l NO <sub>2</sub>	Notas 6, 7, 8 e 9.
Pesticida individual .....	0,10	µg/l	
Pesticidas — total .....	0,50	µg/l	
Selénio .....	10	µg/l Se	
Tetracloroetano e Tricloroetano.	10	µg/l	Soma das concentrações dos compostos especificados.
Trihalometanos (THM)	100 80 (ponto de entrega)	µg/l	

### Notas

1) O valor paramétrico refere-se à concentração residual do monómero na água, calculada em função das especificações, fornecidas pelo fabricante, da migração máxima do polímero correspondente em contacto com a água.

2) O valor deve ser tão baixo quanto possível sem comprometer a eficácia da desinfeção.

3) No caso das entidades gestoras em baixa, o valor aplica-se a uma amostra de água destinada ao consumo humano obtida na torneira, por um método de amostragem adequado, e recolhida de modo a ser representativa do valor médio semanal ingerido pelos consumidores. Sempre que apropriado, os métodos de amostragem e de controlo serão postos em prática de maneira harmonizada, a elaborar de acordo com o n.º 12 do artigo 10.º do presente decreto-lei. Para as entidades gestoras em alta, não há um método de amostragem específico, o que não as isenta da pesquisa destes parâmetros na água fornecida.

4) As entidades gestoras devem seguir as recomendações emanadas pela ERSAR no que diz respeito à amostragem.

5) Compete às entidades gestoras, nomeadamente dos sistemas com estações de tratamento de água, assegurar à saída dessas estações a condição  $[\text{nitratos}]/50 + [\text{nitritos}]/3 \leq 1$ , em que os parênteses retos representam as concentrações em mg/l para os nitratos (NO<sub>3</sub>) e para os nitritos (NO<sub>2</sub>), bem como do valor limite de 0,10 mg/l para os nitritos.

6) Entende-se por pesticidas:

- a) Inseticidas orgânicos;
- b) Herbicidas orgânicos;
- c) Fungicidas orgânicos;
- d) Nematocidas orgânicos;
- e) Acaricidas orgânicos;
- f) Algicidas orgânicos;
- g) Rodenticidas orgânicos;
- h) Controladores orgânicos de secreções viscosas;
- i) Produtos afins (nomeadamente reguladores do crescimento), seus metabolitos, produtos de degradação e de reacção importantes.

7) Só necessitam de ser pesquisados os pesticidas cuja presença seja provável num determinado sistema de fornecimento de água para consumo humano.

8) Quando a lista referida no n.º 2 do artigo 12.º incluir novos pesticidas para os quais não haja métodos analíticos, nem em Portugal, nem na Europa, a sua pesquisa só é obrigatória quando tais métodos estejam devidamente validados.

9) O valor paramétrico aplica-se individualmente a cada pesticida. No caso da aldrina, da dieldrina, do heptacloro e do epóxido do cloro, o valor paramétrico é de 0,030 µg/l.

10) Pesticidas-total, significa a soma de todos os pesticidas detetados e quantificados na mesma amostra do controlo da qualidade da água.

11) O valor paramétrico corresponde à soma das concentrações dos compostos especificados, que são:

- a) Benzo[b]fluoranteno;
- b) Benzo[k]fluoranteno;
- c) Benzo[ghi]perileno;
- d) Indeno[1,2,3-cd]pireno.

12) O valor paramétrico corresponde à soma das concentrações dos compostos especificados, que são: clorofórmio, bromofórmio, dibromoclorometano e bromodichlorometano. Sempre que possível, sem que, no entanto, se comprometa a desinfeção, deve ser reduzida a concentração em compostos organoclorados na água. Para as entidades gestoras em alta responsáveis pelo tratamento da água, o valor paramétrico a cumprir nos pontos de entrega deve ser 80 µg/l.

**Tabela A.2. 2:** Valor máximo recomendado (VMR) e valor máximo admissível (VMA) para a qualidade das águas doces superficiais (A1 e A2) destinadas à produção de água para consumo humano definidos pelo anexo I do Decreto-Lei n.º 236/98 (34).

Parâmetros	Expressão dos resultados	A1		A2	
		VMR	VMA	VMR	VMA
pH, 25°C	Escala de Sorensen	6,5-8,5	–	5,5-9,0	–
Cor (após filtração simples)	mg/l, escala Pt-Co	10	(O) 20	50	(O) 100
Sólidos suspensos totais	mg/l	25	–	–	–
Temperatura	°C	22	(O) 25	22	(O) 25
Condutividade	µS/cm, 20°C	1 000	–	1 000	–
Cheiro	Factor de diluição, a 25°C	3	–	10	–
Nitratos (*)	mg/l $NO_3$	25	(O) 50	–	(O) 50
Fluoretos (¹)	mg/l F	0,7-1,0	1,5	0,7-1,7	–
Cloro orgânico total extraível	mg/l Cl	–	–	–	–
Ferro dissolvido (*)	mg/l Fe	0,1	0,3	1,0	2,0
Manganês (*)	mg/l Mn	0,05	–	0,10	–
Cobre	mg/l Cu	0,02	(O) 0,05	0,05	–
Zinco	mg/l Zn	0,5	3,0	1,0	5,0
Boro	mg/l B	1,0	–	1,0	–
Berílio	mg/l Be	–	–	–	–
Cobalto	mg/l Co	–	–	–	–
Níquel	mg/l Ni	–	–	–	–
Vanádio	mg/l V	–	–	–	–
Arsénio	mg/l As	0,01	0,05	–	0,05
Cádmio	mg/l Cd	0,001	0,005	0,001	0,005
Crómio total	mg/l Cr	–	0,05	–	0,05
Chumbo	mg/l Pb	–	0,05	–	0,05
Selénio	mg/l Se	–	0,01	–	0,01
Mercurio	mg/l Hg	0,0005	0,0010	0,0005	0,0010
Bário	mg/l Ba	–	0,1	–	1,0
Cianetos	mg/l CN	–	0,05	–	0,05
Sulfatos	mg/l $SO_4$	150	250	150	(O) 250
Cloretos	mg/l Cl	200	–	200	–
Substâncias tensoactivas (que reagem com o azul-de-metileno).	mg/l, sulfato de lauril e sódio	0,2	–	0,2	–
Fosfatos (*) (²)	mg/l $P_2O_5$	0,4	–	0,7	–
Fenóis	mg/l $C_6H_5OH$	–	0,001	0,001	0,005
Hidrocarbonetos dissolvidos ou emulsionados	mg/l	–	0,05	–	0,20
Hidrocarbonetos aromáticos polinucleares	µg/l	–	0,2	–	0,2
Pesticidas totais (paratão, hexaclorociclo-hexano, dieldrina e outros).	µg/l	–	1,0	–	2,5
Carência química de oxigénio (CQO) (*)	mg/l $O_2$	–	–	–	–
Oxigénio dissolvido (*) (³)	% saturação de $O_2$	70	–	50	–
Carência bioquímica de oxigénio a (CBO <sub>5</sub> , 20°C) (*)	mg/l $O_2$	3	–	5	–
Azoto Kjeldahl (excluindo o azoto de $NO_2$ e $NO_3$ )	mg/l N	1	–	2	–
Azoto amoniacal	mg/l $NH_4$	0,05	–	1,00	1,50
Substâncias extraíveis com clorofórmio	mg/l	0,1	–	0,2	–
Carbono orgânico total (COT)	mg/l C	–	–	–	–
Carbono orgânico residual após floculação e filtração através de membrana (5µm).	mg/l C	–	–	–	–
Coliformes totais	/100 ml	50	–	5 000	–
Coliformes fecais	/100 ml	20	–	2 000	–
Estreptococos fecais	/100 ml	20	–	1 000	–
Salmonelas		Ausência em 5 000 ml	–	Ausência em 1 000 ml	–

### Anexo 3 – Método dos mínimos quadrados (97)

A forma algébrica da equação de uma reta é dada por:

$$y = a + bx$$

em que, **a** representa a ordenada na origem e **b** o declive da reta.

Esta reta é formada por um conjunto de pares ordenados e independentes,  $(x_1, y_1); \dots; (x_n, y_n)$  onde  $n$  corresponde ao número de pontos da reta. A média dos valores de  $x$  (concentração dos padrões utilizados) representa-se por  $\bar{x}$  e a média dos valores de  $y$  (sinal instrumental) representa-se por  $\bar{y}$ , sendo a posição  $(\bar{x}, \bar{y})$  designada por centroide.

O cálculo do coeficiente de correlação,  $R$ , pode ser usado com um dos parâmetros para avaliar uma calibração analítica:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^N \{(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2] [\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2]}}$$

As curvas de calibração, geralmente, devem apresentar valores de coeficientes de correlação superiores a 0,995, no entanto, quando mais próximo ao valor de 1 (reta de declive positivo) ou de -1 (declive negativo) estiver este coeficiente, maior será a qualidade dos resultados.

Para o cálculo do coeficiente de correlação é necessário ter em conta algumas precauções para que não se cometam erros de interpretação, pois um bom coeficiente de correlação não é sinónimo da existência de uma relação linear. Assume-se ainda que todos os erros associados aos valores de  $x$  são desprezáveis face aos de  $y$ .

Neste método demonstra-se que os coeficientes  $a$  e  $b$  da reta de regressão de  $y$  em  $x$ , são dados por:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

Sendo:



$x_i$  – Valores individuais de concentração

$y_i$  – Valores individuais de sinal instrumental

$\bar{x}$  – Média de valores de  $x$  (concentração dos padrões utilizados)

$\bar{y}$  – Média dos valores de  $y$  (sinal instrumental)

Os coeficientes  $a$  e  $b$  dão uma estimativa da verdadeira função que é limitada pela dispersão inevitável do método. A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual ( $S_{y/x}$ ) da reta de regressão:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + b \cdot x_i)]^2}{N - 2}}$$

Este desvio padrão exprime a dispersão dos valores do sinal instrumental em torno da curva de calibração. Os desvios padrão do declive  $b$  e da ordenada na origem  $a$ , são dados por:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_a = S_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

e podem ser usados para calcular os limites de confiança de  $a$  e  $b$ :

$$a \pm t \cdot S_a \qquad b \pm t \cdot S_b$$

sendo  $t$  o valor da variável de *Student* para o nível de confiança desejado e (N-2) graus de liberdade (71,73).

### Cálculo da Concentração

Uma vez calculados o declive e a ordenada na origem de uma reta de regressão, pode-se calcular o valor de  $x$  correspondente a um valor médio de  $y$ . A concentração de uma amostra por interpolação de uma curva de calibração é calculada pela seguinte expressão:

$$x_i = \frac{y_i - a}{b}$$

**Desvio Padrão do Método ( $S_m$ )**

O desvio padrão do método ( $S_m$ ) é uma característica que permite ao analista verificar a qualidade do seu trabalho:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{b}$$

**Coefficiente de Variação do Método ( $CV_m$ )**

Este parâmetro permite comparar diferentes calibrações e métodos analíticos, sendo expresso pela equação:

$$CV_m = \frac{S_m}{\bar{x}} \times 100$$

## Anexo 4 – Análise de Resíduos (97)

A determinação dos resíduos baseia-se na avaliação da distância entre valores de  $y$  experimentais e os valores de  $y'$  ideais da reta de calibração. Uma representação gráfica destes valores em função das concentrações deve dar origem a um conjunto de pontos que se dispõem aleatoriamente em torno do eixo  $xx$ . Caso contrário poderá ser indicativo de que a função que melhor se ajusta ao conjunto de pontos experimentais poderá ser uma curva e não uma reta.

Para admitir a existência de linearidade numa determinada gama de concentração, foi definido que os valores deviam ter um desvio igual ou inferior a 15%, ou seja, estar compreendidos entre 85% e 115%. Devem ser excluídos resíduos que apresentem desvios superior a 15%, aplicando-se novamente o teste para a gama de concentrações reduzidas até que os requisitos sejam satisfatórios.

A área estimada  $y'$  é calculada através da equação da reta obtida para o composto em questão:

$$y' = a + bx$$

Onde:

$a$  – Ordenada na origem

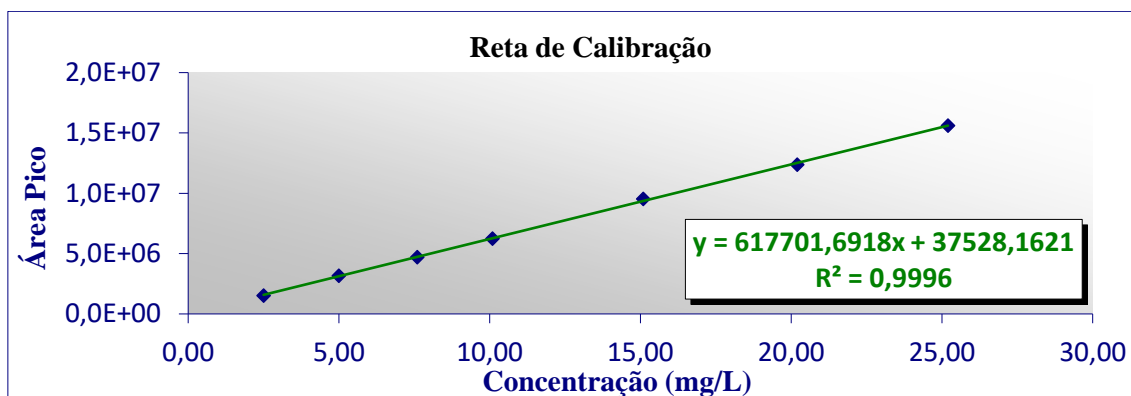
$b$  – Declive da reta

$x$  – Valores individuais de concentração conhecida na solução padrão

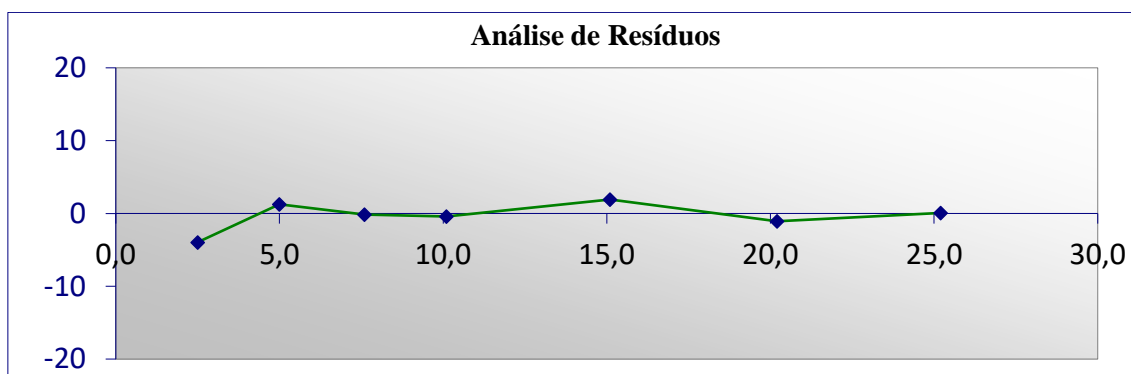
O resíduo representa o quociente entre os valores experimentais e os valores estimados da área da reta de calibração, em percentagem. Após o cálculo destes valores, foi traçado um gráfico de resíduos (%) *versus* concentração ( $\mu\text{g/L}$ ).

**Análise de Resíduos – Dimoxistrobina**

Concentração (µg/L)	Área de Pico
2,5	1519206
5	3165541
7,6	4723884
10,1	6251403
15,1	9544271
20,2	12381137
25,2	15614291



Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração ( mg/L )	Desvio ( % )
1581782	0,96	2,5	-4
3126037	1,01	5	1,3
4732061	1	7,6	-0,2
6276315	1	10,1	-0,4
9364824	1,02	15,1	1,9
12515102	0,99	20,2	-1,1
15603611	1	25,2	0,1



## Anexo 5 – Teste das Áreas Normalizadas (97)

A distribuição dos valores normalizados tem como objetivo avaliar a dispersão dos valores obtidos na calibração em relação aos valores ótimos, de forma que não seja superior a um intervalo previamente estabelecido.

A partir da equação da reta obtida na regressão linear, estimam-se as alturas ou áreas do pico cromatográfico, de cada composto para as concentrações usadas. Para cada uma destas alturas ou áreas, calcula-se a razão entre o valor do sinal obtido experimentalmente e o valor do sinal estimado através da regressão linear.

A concentração para a qual esta razão se aproxima mais de 1 é denominada C<sub>100</sub>, ou seja, é a concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação. A cada uma das concentrações da gama de trabalho estudada, aplica-se a seguinte fórmula:

$$\text{Altura área normalizada} = \frac{\frac{A_i}{C_i} \times 100 \times C_{100}}{A_{100}}$$

Sendo:

$A_i$  – Altura ou área do pico cromatográfico correspondente a uma determinada concentração

$C_i$  – Concentração correspondente à altura ou área  $A_i$

$A_{100}$  – Altura ou área do pico cromatográfico correspondente ao ponto experimental com melhor correlação

$C_{100}$  – Concentração correspondente ao ponto experimental com melhor correlação

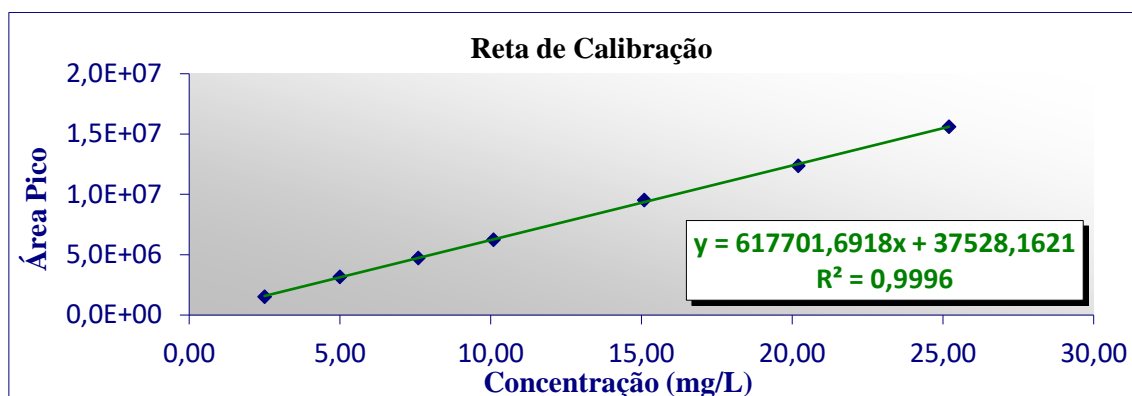
Após o cálculo destes valores, foi traçado um gráfico de valores normalizados *versus* a concentração de cada composto em estudo (µg/L).

Para admitir a existência de linearidade, numa determinada gama de concentração, definiu-se que os valores normalizados deviam estar compreendidos entre 85 e 115%, apresentando um desvio  $\leq 15\%$ .

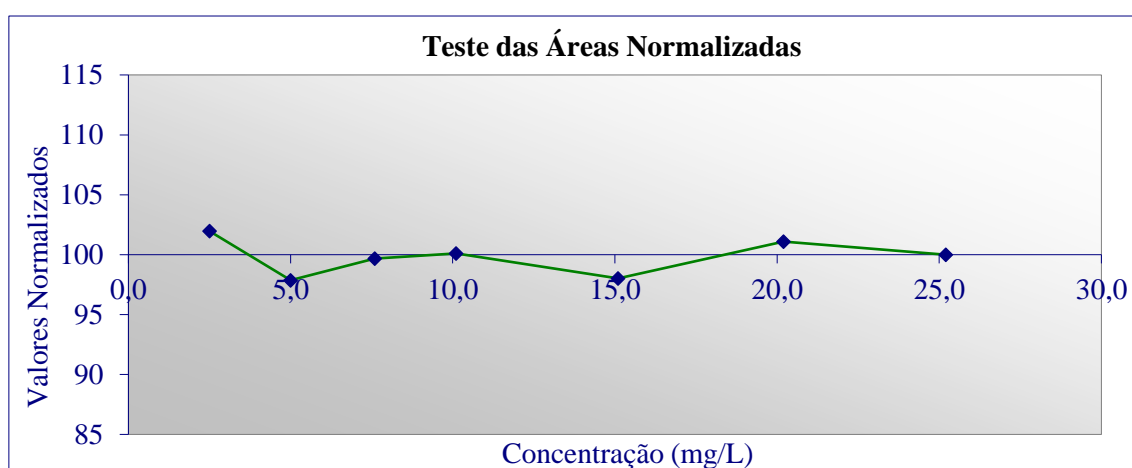
Sempre que existirem valores normalizados que apresentem um desvio superior a 15% estes devem ser excluídos. Caso isto suceda, aplica-se novamente o teste das alturas ou áreas normalizadas até que os requisitos do teste sejam satisfeitos.

### Testes das Alturas ou Áreas Normalizadas – Dimoxistrobina

Concentração (µg/L)	Área de Pico
2,5	1519206
5	3165541
7,6	4723884
10,1	6251403
15,1	9544271
20,2	12381137
25,2	15614291



Área Pico estimada	Área Experimental / Área Estimada	Concentração (mg/L)	Valores Normalizados
1581782	0,96	2,5	102
3126037	1,013	5	97,9
4732061	0,998	7,6	99,7
6276315	0,996	10,1	100,1
9364824	1,019	15,1	98
12515102	0,989	20,2	101,1
15603611	1,001	25,2	100



**Anexo 6 – Teste de RIKILT (99)**

O teste de RIKILT permite a análise da linearidade em cada ponto da reta de calibração. Para isso, deve-se traçar um gráfico da linearidade de modo a avaliar o seu comportamento linear. Para cada concentração  $x_i$  e para cada sinal instrumental  $y_i$ , determina-se a razão  $y_i/x_i$ .

Calcular a resposta média ( $\overline{y/x}$ ) de todos os pontos de calibração, ou seja, de todas as razões  $y_i/x_i$ . A este valor médio atribuir o valor de 100% e calcular a percentagem de cada valor  $y_i/x_i$  face ao valor médio, através da expressão:

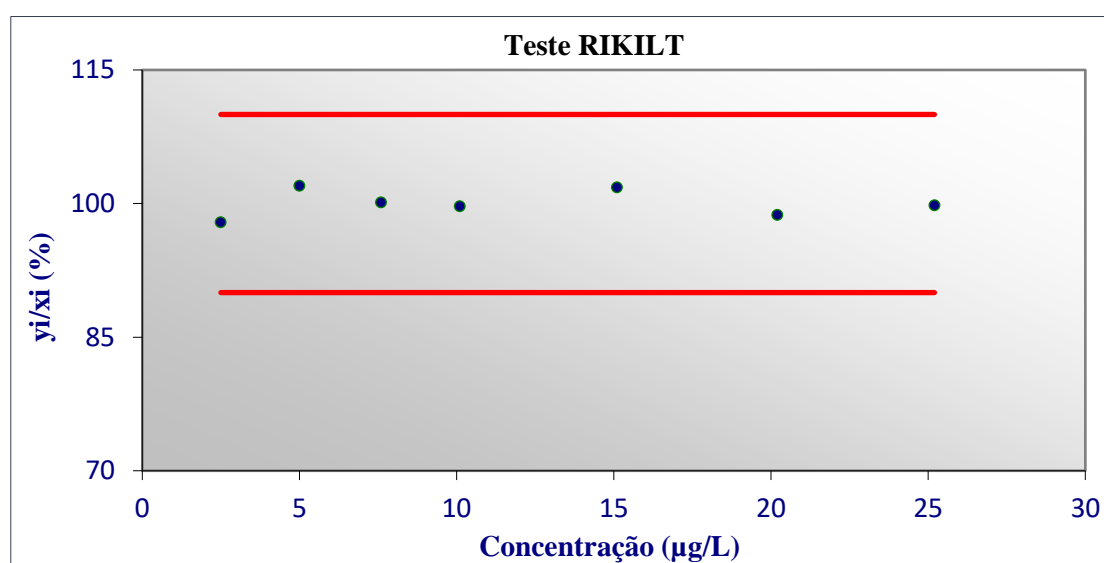
$$y_i/x_i (\%) = 100 \times \frac{(y_i/x_i)}{\overline{y/x}}$$

Colocar num gráfico no eixo dos x o valor das concentrações e no eixo dos y o valor, em percentagem, da razão entre o sinal instrumental e o valor da concentração (%  $y_i/x_i$ ).

Para uma linearidade perfeita, cada ponto de calibração deveria dar um valor de 100%. Para admitir a existência de linearidade numa determinada gama de concentrações, definiu-se que os valores normalizados não devem apresentar um desvio superior a 10%, ou seja, os valores devem estar compreendidos entre 90 e 110%. Se um dos pontos de calibração tiver um valor percentual fora dos limites, o mesmo deve ser rejeitado e o teste de RIKILT deve ser novamente aplicado reduzindo a gama de concentrações.

**Teste de RIKILT – Dimoxistrobina**

Concentração (mg/L) = xi	Área = yi	Razão yi / xi	% yi / xi	Limite Superior	Limite Inferior
2,5	1519206	607682,5	98	110	90
5	3165541	633108,2	102	110	90
7,6	4723884	621563,7	100	110	90
10,1	6251403	618950,8	100	110	90
15,1	9544271	632070,9	102	110	90
20,2	12381137	612927,6	99	110	90
25,2	15614291	619614,7	100	110	90
<b>Média</b>		<b>620845,5</b>			





## Anexo 7 – Teste de Mandel ou Teste de *Fischer-Snedecor* (97)

A linearidade pode ser avaliada através de um modelo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1, o teste de *Fisher-Snedecor* ou teste de Mandel.

- a) A partir de um conjunto de pares ordenados (sinal do pico cromatográfico *versus* concentração), calcula-se a função de calibração linear (ISO 8466-1) e a função de calibração não-linear (ISO 8466-2), bem como os respectivos desvios padrões residuais,  $S_{y/x}$  e  $S_{y2}$ , do seguinte modo:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_l)^2}{N - 2}} \qquad S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y}_{i2})^2}{N - 3}}$$

Sendo:

$N$  – Número de padrões de calibração

$y_i$  – Sinal obtido para um padrão de calibração de determinada concentração

$\bar{y}_l$  – Sinal estimado pela função de calibração linear para um padrão da mesma concentração

$\bar{y}_{i2}$  – Sinal estimado pela função de calibração polinomial do 2º grau para um padrão da mesma concentração

- b) Calcula-se a diferença de variâncias (DS2) pela seguinte equação:

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y2}^2$$

em que  $N$  representa o número de padrões de calibração.

- c) Calcula-se o valor teste, VT:

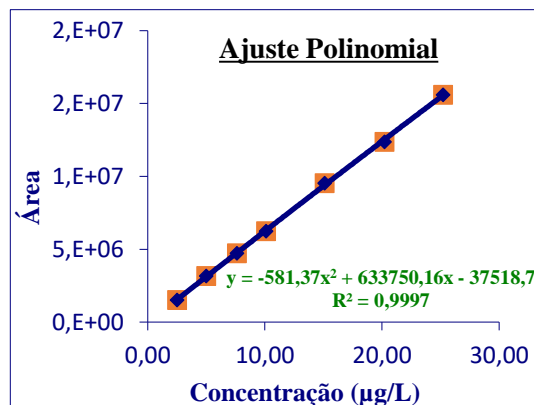
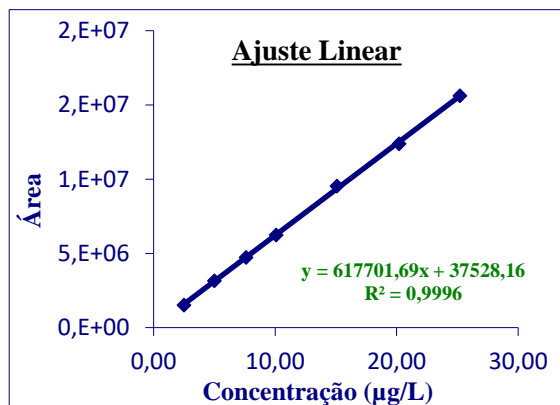
$$VT = \frac{DS^2}{S_{y2}^2}$$

- d) O valor teste (VT) é então comparado com o valor tabelado da distribuição F de *Fisher-Snedecor*, para um grau de confiança de 95%. A decisão é tomada de acordo com o resultado desta comparação:
- Se  $PG \leq F$ : a função de calibração linear não conduz a um ajustamento significativamente melhor, e por isso, a função de calibração é linear.

- Se  $PG > F$ : a função de calibração é não linear e por isso a gama de trabalho deve ser reduzida tanto quanto possível de forma a cumprir a primeira alternativa. Caso não seja possível, deverá ser utilizada uma função de calibração não linear.

**Teste de Mandel – Dimoxistrobina**

Concentração (µg/L)	Área	Área Ajuste Linear	Área Ajuste Polinomial
2,50	1519206	1581782	1543223
5,00	3165541	3126037	3116698
7,60	4723884	4732061	4745403
10,10	6251403	6276315	6304052
15,10	9544271	9364824	9399551
20,20	12381137	12515102	12527013
25,20	15614291	15603611	15563793



**Ajuste Linear**

	$(y-y_i)^2$
	3,92E+09
	1,56E+09
	6,69E+07
	6,21E+08
	3,22E+10
	1,79E+10
	1,14E+08
Soma =	5,64E+10
N-2 =	5
$S_{y/x} =$	1,06E+05

**Ajuste Polinomial**

	$(y-y_i)^2$
	5,77E+08
	2,39E+09
	4,63E+08
	2,77E+09
	2,09E+10
	2,13E+10
	2,55E+09
Soma =	5,10E+10
N-3 =	4
$S_{y/x(2^o)} =$	1,13E+05

$$DS^2 = (N - 2) S^2_{y/x} - (N - 3) S^2_{y/x(2^o)}$$

$$DS^2 = 5,45E+09$$

$$VT = DS^2 / S^2_{y/x(2^o)}$$

$$VT = 0,428$$

$$F_{(1,4)95\%} = 7,71$$

Como  $VT < F$ , a função de calibração linear conduz a um bom ajuste dos pontos experimentais.

## Anexo 8 – Calibração Não Linear de 2º Grau (98)

Sempre que o teste de Mandel dê indicações da impossibilidade de relacionar os dados da calibração segundo uma função de calibração linear usando uma equação de 1º grau, mesmo reduzindo a gama de trabalho, devemos optar por uma calibração não linear, recorrendo a um polinómio de 2º grau.

A função de calibração não linear obedece à seguinte equação de 2º grau:

$$y = ax^2 + bx + c$$

A determinação dos coeficientes  $a$ ,  $b$ , e  $c$  é efetuada recorrendo ao cálculo dos valores intermédios  $Q_{xx}$ ,  $Q_{xy}$ ,  $Q_{x^3}$ ,  $Q_{x^4}$  e  $Q_{x^2y}$ , dados pelas seguintes equações:

$$Q_{xx} = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}$$

$$Q_{xy} = \sum (x_i y_i) - \left( \sum x_i \times \frac{\sum y_i}{N} \right)$$

$$Q_{x^3} = \sum x_i^3 - \left( \sum x_i \times \frac{\sum x_i^2}{N} \right)$$

$$Q_{x^4} = \sum x_i^4 - \frac{(\sum x_i^2)^2}{N}$$

$$Q_{x^2y} = \sum (x_i^2 \times y_i) - \left( \sum y_i \times \frac{\sum x_i^2}{N} \right)$$

Sendo:

$N$  – Número de padrões de calibração

$x_i$  – Valor de concentração de cada padrão de calibração

$y_i$  – Sinal obtido para um padrão de calibração de determinada concentração

Os coeficientes  $a$ ,  $b$ , e  $c$  da equação de 2º grau são calculados através das seguintes equações:

$$a = \frac{(Q_{xy} \times Q_{x^3}) - (Q_{x^2y} \times Q_{xx})}{(Q_{x^3})^2 - (Q_{xx} \times Q_{x^4})}$$

$$b = \frac{Q_{xy} - aQ_{x^3}}{Q_{xx}}$$

$$c = \frac{(\sum y_i - b \sum x_i - a \sum x_i^2)}{N}$$

As características de desempenho da função de calibração são avaliadas através do desvio padrão residual ( $S_{y/x}$ ) da curva de calibração de 2º grau, de acordo com a seguinte equação:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum [y_i - (ax_i^2 + bx_i + c)]^2}{N - 3}}$$

Traça-se o gráfico dos valores dos resíduos (diferença entre o valor real de  $y$  e o valor previsto de  $y$  através da equação da reta de calibração, para cada valor de  $x$ ) em função dos valores de  $x$ . Uma distribuição aleatória dos valores dos resíduos ao longo da linha normal indica a existência de linearidade.

A sensibilidade instrumental do método de ensaio ( $e$ ), no caso duma função de calibração não linear, é dada pela primeira derivada do polinómio de 2º grau (equação da reta tangente à curva de calibração de 2º grau), obtendo-se a seguinte equação:

$$e = 2ax + b$$

As características de desempenho da função de calibração não linear são também avaliadas pelo cálculo da sensibilidade ( $E$ ), ou seja, pelo declive da função no ponto central ( $\bar{x}$ ) da gama de trabalho, de acordo com a seguinte equação:

$$E = 2a\bar{x} + b$$

Sendo:

$\bar{x}$  – Média das concentrações dos padrões de calibração da gama de trabalho em estudo

Calcula-se o desvio padrão do método ( $S_m$ ), o qual permite avaliar a qualidade dos resultados obtidos, através da equação:

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{E}$$

Calcula-se o coeficiente de variação do método ( $CV_m$ ) através da equação:

$$CV_m = \frac{S_{y/x}}{\bar{x}} \times 100$$

O coeficiente de variação do método numa função de calibração não linear deve ser inferior a 2,5% (95).

Para a obtenção de um resultado exato e preciso com uma função de calibração não linear, faz-se necessário que o teste de valor máximo e mínimo da função seja efetuado de acordo com os seguintes passos:

- a) Usa-se a equação da primeira derivada do polinómio de grau 2:

$$e = 2ax + b$$

- b) Calcula-se o valor da concentração ( $x^*$ ) para a qual o valor da sensibilidade é nulo ( $e^x = 0$ ), de acordo com a seguinte equação:

$$x^* = -\frac{b}{2a}$$

**Nota 1:** O ponto de coordenada ( $x^*$ ,  $e^*$ ) é o ponto da reta tangente ao polinómio de grau 2 no ponto de coordenadas ( $\bar{x}$ ,  $E$ ), que cruza o eixo das abcissas, sendo nula a ordenada na origem.

**Nota 2:** A função de calibração não linear não pode ter um valor máximo ou mínimo dentro da gama de trabalho em estudo.

**Nota 3:** O valor máximo de um polinómio de grau 2 é o ponto de inflexão de uma parábola de concavidade virada para baixo ( $a < 0$ ). O valor mínimo de um polinómio de grau 2 é o ponto de inflexão de uma parábola de concavidade virada para cima ( $a > 0$ ).

- Se  $x_l < x^* < x_N$ , o valor máximo ou mínimo do polinómio de 2º grau está dentro da gama de trabalho. Não se pode usar uma função de calibração não linear nesta gama de trabalho.

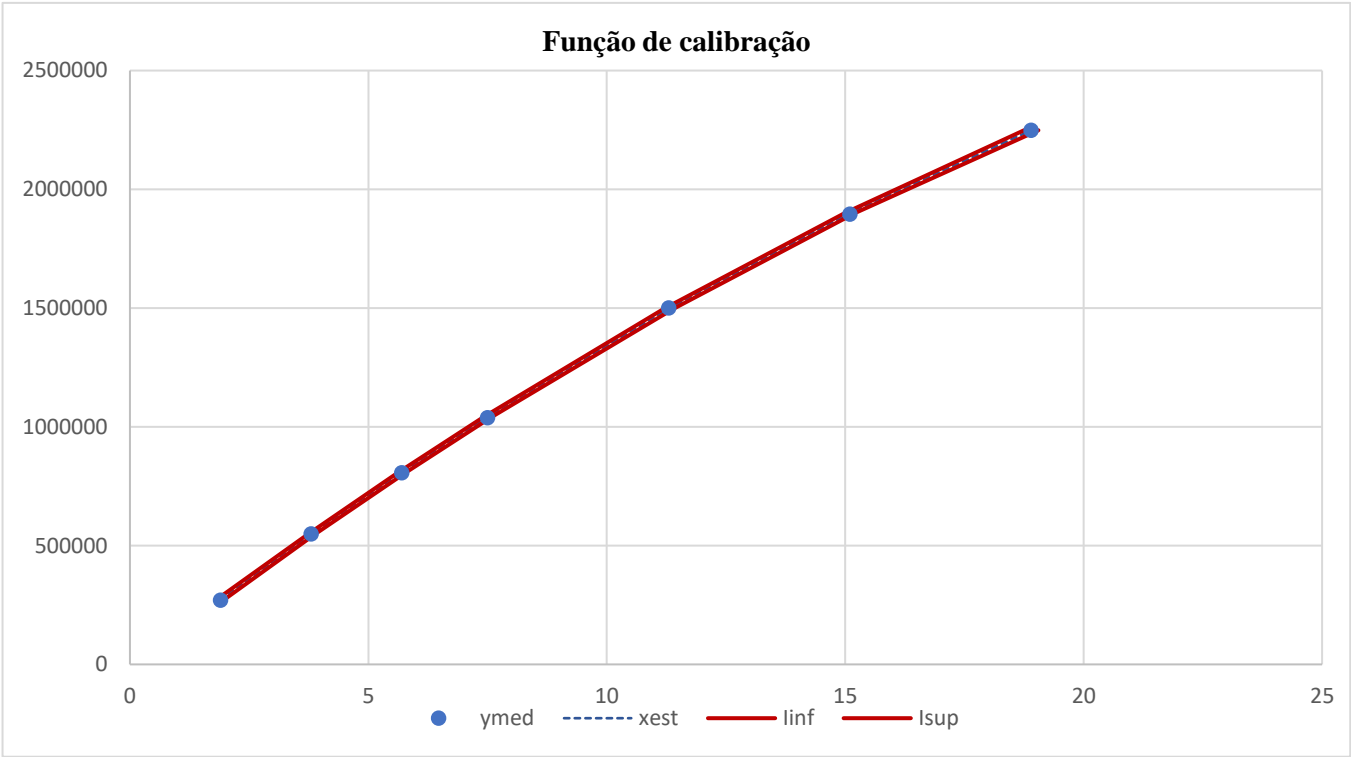
- Se  $x^* < x_1$  ou  $x^* > x_N$ , o valor máximo ou mínimo do polinómio de 2º grau está fora da gama de trabalho. A função de calibração linear pode ser aplicada nesta gama de trabalho.

**Calibração não linear de 2º grau - Bentazona**

	xi	xi2	xi3	xi4	y1	ymed	xiyi	xi2yi	Yi2	n	Var																																																																																																				
x1	1,9	3,61	6,859	13,0321	271567,2	271567	515978	980357	73748718763	1																																																																																																					
x2	3,8	14,44	54,872	208,5136	550556,5	550556	2092115	7950035	303112408448	1																																																																																																					
x3	5,7	32,49	185,193	1055,6	807045,2	807045	4600158	26220899	651321968349	1																																																																																																					
x4	7,5	56,25	421,875	3164,063	1039137	1039137	7793524	58451430	1079804740749	1																																																																																																					
x5	11,3	127,69	1442,897	16304,74	1500904	1500904	16960214	191650421	2252712574450	1																																																																																																					
x6	15,1	228,01	3442,951	51988,56	1896534	1896534	28637660	432428661	3596840276617	1																																																																																																					
x7	18,9	357,21	6751,269	127599	2249636	2249636	42518129	803592634	5060864123544	1																																																																																																					
N	7																																																																																																														
xmed	9,171429																																																																																																														
Σxi	64,2																																																																																																														
Σxi2		819,7																																																																																																													
Σxi3			12305,916																																																																																																												
Σxi4				200333,5																																																																																																											
Σ(xiyi)							103117776,5																																																																																																								
Σyi						8315379,5																																																																																																									
Σyi2									1,30184E+13																																																																																																						
Σxi2yi								1521274438																																																																																																							
Ymed						1187911,4																																																																																																									
<table><tr><td colspan="2"><b>Qxx</b> 230,8942857</td><td colspan="2"><b>a</b> -1845,679893</td><td colspan="4"><b>Desempenho</b></td><td colspan="2"></td></tr><tr><td colspan="2"><b>Qxy</b> 26853867,73</td><td colspan="2"><b>b</b> 154577,9279</td><td colspan="2"><b>Sy/x</b> 3389,277279</td><td colspan="2"></td><td colspan="2"></td></tr><tr><td colspan="2"><b>Qx3</b> 4788,096</td><td colspan="2"><b>c</b> -13659,95634</td><td colspan="2"><b>E</b> 120722,8853</td><td colspan="2"></td><td colspan="2"></td></tr><tr><td colspan="2"><b>Qx4</b> 104347</td><td colspan="2"><b>y=ax²+bx+c</b></td><td colspan="2"><b>Sm</b> 0,028074853</td><td colspan="2"></td><td colspan="2"></td></tr><tr><td colspan="2"><b>Qx2y</b> 547543502,2</td><td colspan="2"></td><td colspan="2"><b>CVm%</b> 0,306112106</td><td colspan="2"><b>OK</b></td><td colspan="2"></td></tr><tr><td colspan="2"></td><td colspan="2"></td><td colspan="2"><b>x*</b> 41,88</td><td colspan="2"><b>OK</b></td><td colspan="2"></td></tr><tr><td colspan="2"></td><td colspan="2"></td><td colspan="2"><b>r2</b> 0,99999</td><td colspan="2"></td><td colspan="2"></td></tr><tr><td colspan="2"></td><td colspan="2"></td><td colspan="2"><b>r</b> 0,99999</td><td colspan="2"><b>OK</b></td><td colspan="2"></td></tr><tr><td colspan="2"></td><td colspan="2"></td><td colspan="2"><b>Critério</b> 0,999</td><td colspan="2"></td><td colspan="2"></td></tr><tr><td colspan="2"></td><td colspan="2"></td><td colspan="2"><b>LOQ</b> 0,28</td><td colspan="2"><b>OK</b></td><td colspan="2"></td></tr></table>												<b>Qxx</b> 230,8942857		<b>a</b> -1845,679893		<b>Desempenho</b>						<b>Qxy</b> 26853867,73		<b>b</b> 154577,9279		<b>Sy/x</b> 3389,277279						<b>Qx3</b> 4788,096		<b>c</b> -13659,95634		<b>E</b> 120722,8853						<b>Qx4</b> 104347		<b>y=ax²+bx+c</b>		<b>Sm</b> 0,028074853						<b>Qx2y</b> 547543502,2				<b>CVm%</b> 0,306112106		<b>OK</b>								<b>x*</b> 41,88		<b>OK</b>								<b>r2</b> 0,99999										<b>r</b> 0,99999		<b>OK</b>								<b>Critério</b> 0,999										<b>LOQ</b> 0,28		<b>OK</b>			
<b>Qxx</b> 230,8942857		<b>a</b> -1845,679893		<b>Desempenho</b>																																																																																																											
<b>Qxy</b> 26853867,73		<b>b</b> 154577,9279		<b>Sy/x</b> 3389,277279																																																																																																											
<b>Qx3</b> 4788,096		<b>c</b> -13659,95634		<b>E</b> 120722,8853																																																																																																											
<b>Qx4</b> 104347		<b>y=ax²+bx+c</b>		<b>Sm</b> 0,028074853																																																																																																											
<b>Qx2y</b> 547543502,2				<b>CVm%</b> 0,306112106		<b>OK</b>																																																																																																									
				<b>x*</b> 41,88		<b>OK</b>																																																																																																									
				<b>r2</b> 0,99999																																																																																																											
				<b>r</b> 0,99999		<b>OK</b>																																																																																																									
				<b>Critério</b> 0,999																																																																																																											
				<b>LOQ</b> 0,28		<b>OK</b>																																																																																																									



Xest	-b/2a	(b/2a)^2	(c-y)/a	Resíduo%	Crítério	Raiz(I)	I(xest)	Inc%	Crítério
1,89	41,87561	1753,566	154,5377	-0,64	OK	1,284878	0,08	4,3	OK
3,82	41,87561	1753,566	305,6957	0,65	OK	1,131654	0,08	2,0	OK
5,70	41,87561	1753,566	444,6628	-0,06	OK	1,107481	0,08	1,4	OK
7,48	41,87561	1753,566	570,4112	-0,29	OK	1,135639	0,08	1,1	OK
11,33	41,87561	1753,566	820,5994	0,28	OK	1,176841	0,10	0,9	OK
15,07	41,87561	1753,566	1034,9540	-0,21	OK	1,150452	0,11	0,7	OK
18,91	41,87561	1753,566	1226,2670	0,07	OK	1,359523	0,15	0,8	OK



## Anexo 9 – Cálculo de Incertezas (107)

### 1. Abordagem “bottom-up”

Nesta abordagem foram combinadas as componentes das incertezas associadas à preparação dos padrões de calibração ( $u_{\text{padrão}}$ ), à interpolação da reta de calibração ( $u_{\text{reta}}$ ), e à precisão intermédia do método ( $u_{\text{prec}}$ ).

- a. A incerteza padrão associada à preparação dos padrões ( $u_{\text{padrão}}$ ) é dada pela seguinte expressão:

$$u_{\text{padrão}} = C \times \sqrt{\left(\frac{u_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_V}{V}\right)^2 + \left(\frac{u_{\text{pur}}}{\text{pur}}\right)^2}$$

Em que:

$C$  – Concentração da solução mãe (m/v)

$u_m$  – Incerteza padrão associada à pesagem do padrão comercial

$m$  – Massa (g) do padrão comercial, pesada na balança

$u_V$  – Incerteza associada à medida do volume (balão volumétrico)

$V$  – Volume (mL) do balão volumétrico

$u_{\text{pur}}$  – Incerteza associada à do padrão comercial

$\text{pur}$  – do padrão comercial

- b. Considerando que a curva de calibração é descrita de forma adequada pelo modelo de regressão “método dos mínimos quadrados” (norma ISO 8466/1), a incerteza associada à interpolação do sinal da amostra na curva de calibração ( $u_{\text{reta}}$ ) será dada pela seguinte equação:

$$u_{\text{reta}} = \frac{S_{y/x}}{b} \times \sqrt{\left[ \frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_a - \bar{y})^2}{b^2 \times \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \right]}$$

Sendo o desvio padrão residual dado por:

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - a - b \times x_i)^2}{N - 2}}$$

Em que:

$S_{y/x}$  – Desvio padrão residual da curva de calibração

$a$  – Ordenada na origem da reta de calibração

$b$  – Declive da curva de calibração

$N$  – N° de leituras de padrões utilizadas no traçado da curva de calibração

$n$  – N° de leituras utilizadas para determinar o teor da amostra

$\bar{y}_a$  – Valor médio das  $n$  leituras da amostra

$\bar{y}$  – Valor médio das  $N$  leituras dos padrões de calibração

$x_i$  – Concentração de cada um dos  $N$  padrões de calibração

$\bar{x}$  – Valor médio das concentrações dos padrões de calibração

$y_i$  – Sinal instrumental de cada padrão de calibração

- c. A incerteza associada à precisão intermédia foi avaliada pela análise de amostras fortificadas, de concentração conhecida, em matrizes diferentes, em condições de precisão intermédia. O valor desta incerteza pode ser avaliado através do desvio padrão associado à média de uma série ( $n$ ) de amostras fortificadas, e é expressa pela seguinte equação:

$$u_{prec}(\%) = \frac{100 \times (S_n)}{\bar{C}_{obs} \times \sqrt{n}}$$

Em que:

$S_n$  – Desvio padrão associado à média de  $n$  valores de concentração de amostras fortificadas.

$\bar{C}_{obs}$  – Valor médio da concentração da amostra nos ensaios de recuperação efetuados.

$n$  – Número de amostras fortificadas analisadas

## 2. Abordagem “top-down”

A componente da incerteza associada à precisão intermédia ( $u_{prec}$ ) e a componente da incerteza associada ao erro sistemático (*bias*) ( $u_{exat}$ ) constituem a base para a estimativa da incerteza da medição. Neste trabalho a abordagem foi baseada nas soluções padrão intermédia e em ensaios de recuperação.

- a. Incerteza associada à exatidão dos ensaios de recuperação

Na ausência de matérias de referência certificados (MRC) ou de ensaios interlaboratoriais para estimar a componente da incerteza associada à exatidão do método de ensaio, os resultados obtidos nos ensaios de recuperação podem ser usados como uma forma de avaliar a exatidão do método de ensaio.

O erro relativo dos ensaios de recuperação face ao valor teórico da amostra fortificada é dado pela seguinte expressão:

$$E_r = \frac{|C_{obs} - C_{spike}|}{C_{spike}}$$

Em que:

$E_r$  – Erro relativo dos ensaios de recuperação efetuados face ao valor teórico da amostra fortificada

$C_{spike}$  – Concentração teórica da amostra fortificada

A incerteza associada à exatidão do método é então obtida através da seguinte expressão:

$$u_{exat}(\%) = \frac{100 \times (S_{E_r})}{\overline{E_r} \times \sqrt{n}}$$

Em que

$S_{E_r}$  – Desvio padrão associado ao erro relativo dos ensaios de recuperação efetuados

$\overline{E_r}$  – Valor médio do erro relativo dos ensaios de recuperação efetuados

$n$  – Número de amostras fortificadas

### **Incerteza Padrão Combinada**

As componentes de incerteza padrão relativa consideradas nas duas abordagens realizadas neste trabalho foram estimadas a partir dos dados de validação e/ou do controlo da qualidade do ensaio. Estas componentes de incerteza podem ser combinadas da seguinte forma: quando o método é aplicável numa gama restrita de concentrações, as componentes de incerteza podem ser contabilizadas simplesmente como componentes independentes de uma expressão aditiva. Neste caso, a incerteza padrão combinada  $u_c(c)$  de uma determinada grandeza C, pode ser calculada pelas seguintes expressões de acordo com o tipo de abordagem:

$$u_c(c) = \sqrt{u_{padr\tilde{a}o}^2 + u_{reta}^2 + u_{prec}^2}$$

ou

$$u_c(c) = \sqrt{u_{prec}^2 + u_{exat}^2}$$

Em determinadas situações é aceitável considerar certos componentes como desprezáveis, e como tal, não serem contabilizados no balanço final. Como critério para se considerar um componente como desprezável, deverá ser usada a relação de 1/5 do maior componente considerado.

### **Incerteza Expandida**

A incerteza expandida, simbolicamente representada por  $U$ , é a medida da incerteza, dada para uma função de distribuição de probabilidade apropriada ao resultado (distribuição normal), para um nível elevado de confiança (normalmente de aproximadamente 95% ou 99%). A incerteza expandida é igual à incerteza combinada afetada de um coeficiente ou fator de expansão, normalmente situado entre 2 e 3. Habitualmente é utilizado um fator de expansão de  $k=2$  (correspondente a um nível de confiança de aproximadamente 95%).

A incerteza expandida é assim determinada a partir da incerteza combinada pelas seguintes expressões:

$$U(C) = k \times u_c$$

$$U(C) = 2 \times u_c$$

### **Expressão do Resultado**

A concentração mais provável será dada por:

$$C \pm U(C) \text{ [unidades de concentração]}$$

A incerteza associada ao resultado deverá ser apresentada com um ou no máximo dois algarismos significativos. O resultado do ensaio deverá ser apresentado com um número de dígitos que será limitado pela incerteza do resultado.

